



Rita Lourenço João

Licenciada em Engenharia Biomédica

Desenvolvimento e Avaliação *in vitro* de um Revestimento Multifuncional para possível aplicação em Implantes Ósseos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Catarina Ferreira dos Santos, Assistente Equiparada, EST-IPS

Co-orientador: Célia Maria Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Doutor Pedro de Sousa Gomes

Vogal: Doutora Catarina Ferreira dos Santos



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro, 2015

Rita Lourenço João

Licenciada em Engenharia Biomédica

**Desenvolvimento e Avaliação *in vitro* de um
Revestimento Multifuncional para possível aplicação
em Implantes Ósseos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Catarina Ferreira dos Santos, Assistente Equiparada, EST-IPS

Co-Orientador: Célia Maria Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Doutor Pedro de Sousa Gomes

Vogais: Doutora Catarina Ferreira dos Santos

Desenvolvimento e Avaliação *in vitro* de um Revestimento Multifuncional para possível aplicação em Implantes Ósseos

Copyright © 2015. Todos os direitos reservados. Rita Lourenço João, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Just have a little faith”
W.M.

Agradecimentos

Após esta longa jornada, dou por fim a mais um ciclo da minha vida, a conclusão da dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica. Várias foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Assim desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Professora Catarina Santos, da Escola Superior de Tecnologia do Instituto Politécnico de Setúbal pela proposta do tema da dissertação, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho, por toda a disponibilidade, dedicação, incentivo e todo o enriquecimento científico e profissional, um muito obrigado;

À minha co-orientadora, Professora Célia Henriques pela disponibilidade, paciência, ajuda e explicação detalhada em toda a parte de engenharia de células e tecidos, já que esta foi uma área completamente nova para mim;

Ao professor Jorge Silva por todo o auxílio prestado e todas as sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do GREAT LAB: Ana Fradinho, Francisco Costa e Tânia Vieira, pelos muito bons momentos passados no laboratório, brincadeiras e toda ajuda prestada.

Ao Senhor João Duarte, do Laboratório de Tecnologias Mecânicas do Instituto Politécnico de Setúbal, por toda a ajuda e disponibilidade.

Um especial agradecimento à Cátia Piedade, amiga de longa data, por toda a amizade, alegria e ajuda sempre que precisei. À minha amiga Eva que por mais longe que esteja está sempre presente.

Às minhas amigas Joana Rosa e Joana Sequeira pelo companheirismo e amizade de longa data.

Por fim e não menos importante, um especial agradecimento aos meus pais e irmão que sempre acreditaram em mim, pela paciência, esforço e apoio durante este tempo, pois sem eles nada disto seria possível.

Resumo

As fraturas ósseas têm sido consideradas como um problema sócio económico mundial afetando sobretudo os jovens e idosos. No caso de pequenas correções de fraturas ou defeitos ósseos é necessário a aplicação de implantes biodegradáveis que atuem de forma temporária durante o período de formação do novo tecido ósseo. Uma das grandes vantagens da sua aplicação é evitar uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção. Para isso, o Magnésio (Mg) e as suas ligas têm vindo a ser considerados como uma boa opção para este tipo de implantes temporários pois para além de serem biodegradáveis e biocompatíveis possuem propriedades semelhantes ao osso. No entanto, a sua elevada taxa de degradação em ambiente biológico é uma desvantagem para a sua utilização que conduz à perda da sua funcionalidade.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver revestimentos multifuncionais biocompatíveis, para a superfície do implante biodegradável, que permitam controlar a taxa de degradação do Mg e em simultâneo promovam a adesão e proliferação celular no local afetado. Neste trabalho, foram desenvolvidos três tipos de revestimentos biocompatíveis: Fosfatos, Fosfatos com nanopartículas de hidroxiapatite e fosfatos com nanopartículas de hidroxiapatite e óxido de grafeno aplicados na superfície da liga de Mg AZ31 através do método de eletrodeposição/eletroforese química. Foi realizado um tratamento térmico e avaliada a sua influência na resposta celular e na sua resistência à degradação. As propriedades físico-químicas do revestimento foram obtidas por microscopia electrónica de varrimento e de transmissão, microscopia de *Raman*, difração de raios-X e microscopia de força atómica. Foram ainda analisadas medições do ângulo de contacto da superfície dos revestimentos e realizados ensaios de degradação em soluções fisiológicas. A resposta celular aos revestimentos foi testada *in vitro* através da avaliação da adesão e proliferação de células osteoblásticas (*Saos-2*).

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento térmico modifica a estrutura do revestimento e promove a adesão celular. A incorporação do óxido grafeno no revestimento de fosfatos e hidroxiapatite permite aumentar a resistência à degradação e promover uma melhor resposta celular.

Palavras-chave: Implantes biodegradáveis, ligas de Magnésio, revestimentos multifuncionais, hidroxiapatite, óxido de grafeno, biocompatibilidade

Abstract

Bone fractures have been considered as a global social and economic problem particularly affecting the young and old people. For small corrections of fractures or bone defects the application of biodegradable implants is necessary to act temporarily for the new bone formation period. One of the great advantages of its application is to avoid a second surgical intervention for their removal. For this, Magnesium and its alloys have been considered a good option for this type of temporary implants as well as being biodegradable and biocompatible have similar properties to bone. However, its high degradation rate on the biological environment is a disadvantage for their use leading to loss of their functionality.

The objective of this study was to develop multifunctional biocompatible coatings for the surface of the biodegradable implant, to control the rate degradation of Mg and simultaneously promote cell adhesion and proliferation on the affected site. In this work, three types have been developed biocompatible coatings: phosphates, hydroxyapatite nanoparticles with phosphate and phosphate with hydroxyapatite nanoparticles and graphene oxide applied on the surface of AZ31 Mg alloy by eletrodeposition/eletropherese method. Heat treatment was carried out and evaluated its influence in the cellular response and its resistance to degradation. The physicochemical properties of the coating were obtained by scanning electron microscopy and transmission microscopy, *Raman*, X-ray diffraction and atomic force microscopy. They also analyzed the coatings surface contact angle measurements performed and degradation assays on physiological solutions. The cellular response to the coatings was tested in vitro by evaluating the adhesion and proliferation of osteoblastic cells (Saos-2).

The results shows that heat treatment change the structure and promote cell adhesion. The incorporation of graphene oxide in the coating of phosphates and hydroxyapatite can increase the resistance to degradation and increase the cellular response.

Keywords: Biodegradable implants, Magnesium alloys, multifunctional coatings, hydroxyapatite, graphene oxide, biocompatibility

Índice

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxii
Siglas, Acrónimos e Abreviaturas.....	xxiii
Enquadramento	xxv
Capítulo 1.....	1
Introdução	1
1.1 Magnésio e as suas Ligas em aplicações biomédicas.....	2
1.1.1 Degradação do Mg e suas Ligas <i>in vivo</i>	3
1.2 Tipos de Revestimentos aplicados no Magnésio e nas suas Ligas	8
1.2.1 Revestimentos de Fosfatos	8
1.2.2 Revestimentos de Nanopartículas de Hidroxiapatite.....	9
1.2.3 Revestimentos com incorporação de Óxido de Grafeno	10
1.2.4 Métodos de deposição dos revestimentos em substratos de Mg e suas Ligas	12
1.3 Efeito do tratamento térmico dos revestimentos na resposta biológica.....	13
1.4 Comportamento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do Magnésio e seus revestimentos	14
Capítulo 2.....	16
Materiais e Métodos.....	16
2.1 Preparação dos revestimentos multifuncionais.....	17
2.1.1 Eletrólito	17
2.1.2 Síntese das nanopartículas de Hidroxiapatite	18
2.1.3 Deposição Eletroquímica.....	18
2.1.4 Tratamento Térmico	20
2.2 Ensaio de degradação em condições fisiológicas	21
2.2.1 Solução simuladora de fluido corporal	21
2.2.2 Degradação fisiológica	21
2.3 Técnicas de caracterização dos revestimentos.....	22
2.3.1 Microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM).....	22
2.3.2 Microscopia electrónica de transmissão (TEM)	23
2.3.3 Microscopia de Força Atómica (AFM)	25

2.3.4 Difração de Raio-X (DRX).....	25
2.3.5 Ângulo de Contacto	27
2.3.6 Espectroscopia de <i>Raman</i>	28
2.3.7 Microscopia de Fluorescência	29
2.4 Estudos <i>in vitro</i>	29
2.4.1 Preparação das amostras para as culturas celulares.....	29
2.4.2 Cultura celular	30
2.4.2.1 Viabilidade celular	30
2.4.2.2 Proliferação celular	30
2.4.3 Fixação e marcação de células.....	31
Capítulo 3.....	32
Discussão dos Resultados.....	32
3.1 Multifuncionalização (com HAp e GO) e Tratamento Térmico do revestimento aplicado na liga de Mg AZ31	33
3.2 Caracterização físico-química dos revestimentos multifuncionais.....	35
3.2.1 Microestrutura e topografia da superfície.....	35
3.2.2 Estrutura cristalina	40
3.2.3 Composição química	41
3.2.4 Molhabilidade	42
3.3 Estudos de degradação dos revestimentos em condições fisiológicas.....	43
3.4 Interação celular com os revestimentos multifuncionais.....	47
3.4.1 Adesão e Proliferação celular	47
Capítulo 4.....	59
Conclusões e Perspectivas Futuras.....	Error! Bookmark not defined.
Bibliografia	60
Apêndice	67

Lista de Figuras

Figura 1.1: Dispositivos de fixação interna biodegradáveis de ligas de Mg	3
Figura 1.2: Representação da degradação do implante biodegradável (Mg) em meio biológico ..	4
Figura 1.3: Representação do tempo de vida ideal do implante de Mg.....	5
Figura 1.4: Representação esquemática do controlo da taxa de degradação através da aplicação de um revestimento	8
Figura 1.5: Estrutura química do grafeno, GO e rGO	11
Figura 1.6: Representação do processo de deposição por eletroforese	13
Figura 2.1: Amostras da liga de Mg AZ31 utilizadas como substrato	17
Figura 2.2: a) Montagem do processo de eletrodeposição química b) célula eletroquímica para ensaio de deposição dos revestimentos	19
Figura 2.3: Curvas de polarização para os três diferentes eletrólitos	19
Figura 2.4: Diferentes revestimentos depositados no substrato da Liga de Mg AZ31	20
Figura 2.5: Forno tubular para tratamento térmico dos revestimentos	21
Figura 2.6: a) Microscópio electrónico de varrimento ICEMS-IST e b) representação da coluna FEG-SEM.....	23
Figura 2.7: a) Microscópio electrónico de transmissão no IST b) representação da coluna do TEM	24
Figura 2.8: a) Microscópio de força atómica IST b) representação dos componentes	25
Figura 2.9: Ilustração da lei de <i>Bragg</i> para a difração de Raios-X.....	26
Figura 2.10: Representação da medida do ângulo de contacto.....	27
Figura 2.11: Representação dos processos de dispersão <i>Rayleigh</i> e <i>Raman</i>	28
Figura 3.1: Curvas potencioestáticas para os diferentes revestimentos.....	33
Figura 3.2: Representação da formação do revestimento de Fosfatos sobre a liga AZ31 por electrodeposição à temperatura ambiente	34
Figura 3.3: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos	35
Figura 3.4: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos-HAp	35
Figura 3.5: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos-HAp/GO	36
Figura 3.6: Imagens de mapas de EDX correspondentes ao revestimento Fosfatos HAp/GO: a) Imagem de SEM, b) sinal correspondente ao Mg, c) sinal de fosfato, d) sinal de carbono e) sinal de oxigénio	37

Figura 3.7: Imagens de AFM: a) topografia do revestimento Fosfatos-HAp/GO b) imagem ampliada 3D do revestimento Fosfatos-HAp/GO c) topografia do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t (300 °C, 10 min) d) imagem 3D ampliada do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t	38
Figura 3.8: Imagens de TEM do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t: a) e b) Presença de partículas de HAp de tamanho nanométrico no revestimento, c) e d) porosidade e estrutura cristalina da HAp.	39
Figura 3.9: Espectro de DRX dos revestimentos Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t	40
Figura 3.10: Espectro de <i>Raman</i> para: Fosfatos, Fosfatos-t, Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t	41
Figura 3.11: Ângulos de contacto dos revestimentos com e sem tratamento térmico	42
Figura 3.12: Curvas de potencial de circuito aberto para as amostras Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t	44
Figura 3.13: Curvas de polarização potenciodinâmicas para os diferentes revestimentos em condições fisiológicas (37,5 °C, pH 7,4)	45
Figura 3.14: Imagens de microscopia de fluorescência do revestimento de Fosfato-HAp/GO obtidas usando os vários filtros disponíveis no microscópio	47
Figura 3.15: Viabilidade celular nos diversos revestimentos medida ao fim de 1, 3, 5, 7 e 9 dias	48
Figura 3.16: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, dos núcleos e dos citoesqueletos das células obtidas por marcação com DAPI (azul) e com Faloidina (vermelho), respetivamente: a) CCMg ampliação 10x b) CCMg ampliação 40x, c) CCv ampliação 10x e d) CCv ampliação 40x.	49
Figura 3.17: Imagens de contraste de fase de células semeadas em lamelas de vidro (CCv) (ampliação 10x)	50
Figura 3.18: Medições de absorvância correspondente à adesão das células após as 24 h para os diversos revestimentos na segunda cultura	51
Figura 3.19: Avaliação da proliferação celular para os diversos revestimentos para 24 h, 48 h e 72 h	53
Figura 3.20: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em no controle de células em lamelas de vidro (CCv)	54
Figura 3.21: Sobreposição das imagens de microscopia fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células numa amostra de AZ31 (CCMg)	54

Figura 3.22: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostra de: a) Fosfatos b) Fosfatos-t.	55
Figura 3.23: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostras de: a) Fosfatos-HAp b) Fosfatos-HAp-t	55
Figura 3.24: Imagens de fluorescência de células na amostra de Fosfatos-HAp-t: a) Marcação Faloidina b) Marcação DAPI	55
Figura 3.25: imagens de fluorescência de células na amostra de Fosfatos-HAp-t: a) e b) Marcação Marcação DAPI	56
Figura 3.26: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostras de Fosfatos-HAp/GO	56
Figura 3.27: Imagens de SEM de células na superfície de Mg (CCMg)	57
Figura 3.28: Imagens de SEM de células do revestimento Fosfatos-HAp/GO	57
Figura 3.29: Imagens de SEM de células do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t	57

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Propriedades do osso e de vários materiais utilizados em implantes ósseos	2
Tabela 1.2: Taxa de degradação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de diferentes ligas de Mg	6
Tabela 1.3: Composição da Liga de Mg AZ31	6
Tabela 1.4: Limites de toxicidade de elementos constituintes das ligas de Mg.....	7
Tabela 2.1: Composição da Liga de Mg AZ31	17
Tabela 2.2: Concentração de íons presentes na solução SBF.....	21

Siglas, Acrónimos e Abreviaturas

AAOS – *American Academy of Orthopedic Surgeons*

AFM – Microscopia de força atómica

ATCC – *American Type Culture Collection*

B-TCP – Beta trifosfatos de cálcio

CaP – Fosfatos de cálcio

CCMg - Controle de células no magnésio

DRX – Difração de Raios-X

E – Módulo de elasticidade

ED – Eletrodeposição

EDP – Deposição por eletroforese

EDS – Espectroscopia dispersiva de raios X

EST – Escola Superior de Tecnologia

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologias

GO – Óxido de grafeno

GTA – Glutaraldeído

HAp – Hidroxiapatite

IPS – Instituto Politécnico de Setúbal

Mg – Magnésio

OCP – Potencial de circuito aberto

PBS – Solução tampão de fosfato salino

PFA – Paraformaldeído

PLA – Ácido Polilático

PP – Polipropileno

rGO – Óxido de grafeno reduzido

SBF – Fluido corporal simulado

SCE – Eléctrodo saturado de calomelanos

SEM – Microscopia electrónica de varrimento

SS – Aço inoxidável

TEM – Microscopia electrónica de transmissão

Ti – Titânio

UNL – Universidade Nova de Lisboa

Enquadramento

Atualmente, ocorrem no mundo cerca de 50 milhões de fraturas ósseas por ano [1], das quais segundo a AAOS (*American Academy of Orthopedic Surgeons*) surgem aproximadamente 6,2 milhões de fracturas nos Estados Unidos, em que 56% requer a utilização de dispositivos de fixação interna como parafusos, e placas de fixação [2]. Hoje em dia, têm sido realizados mais de 8 milhões de intervenções cirúrgicas de reparação de fraturas em todo o mundo [1]. Estas fraturas resultam principalmente de quedas, acidentes, defeitos congénitos, lesões relacionadas com desportos radicais e ainda devido ao aumento do envelhecimento da população. Com o aumento do envelhecimento da população ocorre a prevalência da osteoporose o que leva a um aumento significativo do número de fraturas. Estes casos tornam-se assim num grave problema mundial com elevado impacto sócio - económico. Estas fraturas atingem principalmente a população idosa e os jovens. Por estas razões, o tratamento de fraturas continua a ser um dos focos clínicos no campo da engenharia de tecidos [3] e na engenharia biomédica [4] com mais importância. Para pequenas correções de fraturas, ou defeitos ósseos os implantes biodegradáveis têm sido sugeridos como uma boa opção, atuando como mecanismo de fixação temporária enquanto ocorre o período de regeneração óssea. Este tipo de implantes destinam-se a fraturas maxilo-faciais, pequenas correções de fraturas ou defeitos ósseos. No caso das crianças é uma ótima aplicação devido à sua rápida regeneração óssea [5] quando comparado em adultos.

O Magnésio e as suas ligas têm sido considerados como uma boa opção para implantes temporários biodegradáveis para este tipo de fraturas de tamanho reduzido. Por serem biodegradáveis e biocompatíveis possuem propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo e a sua utilização evita uma segunda cirurgia [6]. No entanto, a desvantagem da sua utilização é a elevada taxa de degradação em ambiente biológico conduzindo à perda da sua integridade mecânica [4]. Para evitar este problema é necessário desenvolver revestimentos multifuncionais para a superfície do implante de magnésio que atuem como estruturas bioativas, osteogénicas e osteocondutoras no local afetado [7]. Para isso, a Engenharia Biomédica e a Engenharia de Tecidos atuam em conjunto de modo a promover as características desejadas para a interação entre o material e o meio biológico prevenindo uma resposta inflamatória. O principal objetivo deste trabalho, consistiu no desenvolvimento e na funcionalização da superfície da Liga de Magnésio AZ31 através da aplicação de um revestimento multifuncional por eletrodeposição /eletroforese, que controle a taxa de degradação e em simultâneo promova a adesão e proliferação celular para aplicação em implantes ósseos.

Foi escolhida a liga de Magnésio AZ31 devido às suas propriedades e frequente utilização em aplicações biomédicas [8, 9]. Os materiais constituintes do revestimento foram os fosfatos com a adição de nanopartículas de hidroxiapatite e a incorporação do óxido de grafeno devido à sua elevada biocompatibilidade e outras propriedades que serão descritas ao longo deste trabalho.

A dissertação divide-se em quatro capítulos principais. No primeiro capítulo é descrito o estado de arte que irá ajudar a compreensão e discussão dos resultados deste trabalho, no segundo capítulo são descritos os métodos e materiais utilizados. No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos da caracterização dos revestimentos bem como a biocompatibilidade *in vitro*. Por fim, no quarto capítulo são apresentadas as conclusões do trabalho e perspectivas futuras.

Capítulo 1

Introdução

A Ortopedia tem sofrido enormes avanços com o desenvolvimento da área dos biomateriais em conjunto com a engenharia de tecidos. O conjunto destas duas áreas permite o desenvolvimento e/ou modificação de materiais, bem como a sua avaliação *in vitro* ou *in vivo* para reparação e regeneração de um determinado tecido. O fabrico de implantes ósseos à base de ligas metálicas não degradáveis como o titânio (Ti) e o aço inoxidável (SS) apresentam desvantagens como *stress shielding*, (desequilíbrio de cargas exercidas sobre o osso) que pode afetar o crescimento e remodelação do novo osso ocorrendo a perda da funcionalidade do implante [5]. A utilização de ligas de cobalto crómio (Co-Cr) têm revelado efeitos adversos e os seus produtos de degradação são considerados tóxicos para o organismo pelo que também não é considerado uma boa opção para implantes ósseos. Além disso, muitos autores referem que estes materiais estão ainda associados a várias complicações como a interferência no desenvolvimento e crescimento do esqueleto, irritação do tecido e interferência com imagens radiológicas [8]. A constituição de implantes ósseos à base de ligas metálicas não degradáveis podem ser utilizados em placas de fixação, parafusos e pinos. No entanto, para além das desvantagens enumeradas entre o osso e o metal, nestes metais é necessário uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção aumentando o risco de infeções [5, 8]. Os polímeros biodegradáveis como por exemplo: o PLA têm surgido como materiais alternativos de modo a evitar esta segunda cirurgia, no entanto as suas propriedades mecânicas como a resistência à compressão não são favoráveis. Para além disso existem estudos que indicam que a presença de polímeros induzem reações adversas ao corpo humano [2, 8] sendo excluída a sua aplicação em implantes ósseos que requerem elevada biocompatibilidade.

Na **Tabela 1.1**, faz-se uma comparação entre as propriedades físicas e mecânicas do osso e outros materiais utilizados em implantes ósseos.

Tabela 1.1: Propriedades do osso e de vários materiais utilizados em implantes ósseos [10]

Material	Densidade (g/cm ³)	E (GPa)	Compressive yield strength (MPa)	Tenacidade à fratura (MPa m ^{1/2})
Osso	1,80 - 2,10	3,0 - 20	130 – 180	3,0 – 6,0
Mg	1,74 - 2,00	41 - 45	65 – 100	15 – 40
Liga Ti	4,40 - 4,50	110 - 117	758 – 1117	55 – 115
Liga Co-Cr	8,30 - 9,20	230	450 – 1000	-
SS	7,90 - 8,10	189 - 205	170 – 310	50 – 200
HAp sintética	3,10	73 - 117	600	0,7
PLA	1,25 - 1,29	2,2 - 3,3	-	-

O desempenho mecânico do osso é de grande interesse do ponto de vista clínico, devido a isto, é importante que o implante ósseo tenha propriedades mecânicas semelhantes ao local de fixação - osso. Pela análise da **Tabela 1.1** verifica-se que dos materiais presentes o Mg é o material que mais se aproxima das propriedades do tecido ósseo. Por exemplo, a densidade do Mg encontra-se entre 1,74 - 2,00 g/cm³ apresentando valores semelhantes à densidade do osso (1,80 – 2,10 g/cm³), por outro lado, o módulo de elasticidade (E) do Mg encontra-se entre 41 – 45 GPa e o do osso entre 3,0 – 20 GPa, sendo esta uma propriedade muito importante que proporciona uma medida de resistência do material. A hidroxiapatite (HAp) tem sido muito utilizada em implantes ósseos devido à sua elevada biocompatibilidade, no entanto a baixa tenacidade à fratura limita a sua utilização como implante. Este material torna-se importante em revestimentos devido à sua elevada biocompatibilidade com o tecido ósseo [10].

1.1 Magnésio e as suas Ligas em aplicações biomédicas

Nos últimos anos o Magnésio e as suas ligas têm sido considerados materiais promissores biodegradáveis para aplicações em *stents* cardiovasculares, sistemas de dilatação de vasos e implantes ósseos [11], pois para além da sua biodegradação e biocompatibilidade apresenta uma baixa densidade e propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo, como referido anteriormente. Estas propriedades semelhantes ao tecido ósseo facilitam a osteointegração do Mg reduzindo o efeito de “*stress*” que pode conduzir à redução da estimulação do crescimento do novo osso e à sua remodelação [10]. Estes materiais são usados para pequenas correções de fraturas ou defeitos ósseos de pequenas dimensões, como por exemplo placas de fixação e parafusos (**Figura 1.1**).

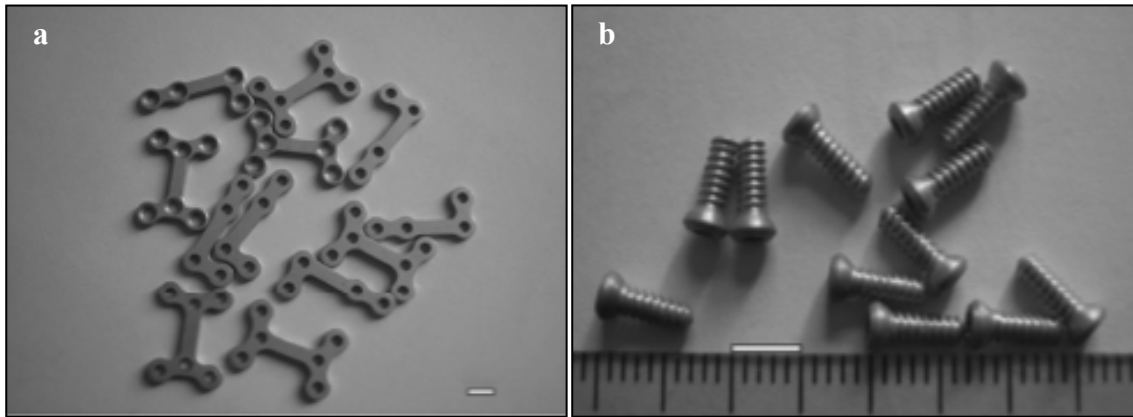


Figura 1.1: Dispositivos de fixação interna biodegradáveis de ligas de Mg: **a)** placas de fixação **b)** parafusos de fixação (Barra: 10 mm) [5]

Recentemente verificou-se que o Mg poderá também ter propriedades antibacterianas [12], sendo esta uma propriedade importante para este tipo de implantes uma vez que a presença de microrganismos poderá comprometer a regeneração óssea. Uma grande vantagem destes implantes de Mg, por serem biodegradáveis permitem evitar uma segunda intervenção cirúrgica em situações que requerem a remoção ou substituição do implante em determinada fase do tratamento. Esta vantagem permite reduzir os custos para o paciente bem como para o sistema de saúde e ainda reduz o risco de infecções. Outra vantagem do Mg para a sua utilização em implantes ósseos é a sua abundância no organismo sendo que o Mg é o quarto cátion mais abundante no corpo humano tornando-o facilmente eliminado pela corrente sanguínea e excretado através de urina [9, 13]. A presença do Mg no tecido ósseo é benéfica para a resistência do osso bem como para o seu crescimento. Sendo assim, em reparações e regenerações ósseas as ligas de Mg apresentam melhores propriedades físicas e mecânicas do que qualquer outro metal ou polímero [14]. No entanto, o Mg apresenta uma elevada taxa de degradação quando é exposto a ambientes biológicos comprometendo a sua funcionalidade [6].

1.1.1 Degradação do Mg e suas Ligas *in vivo*

Quando o Mg é exposto à atmosfera, é formado um filme de passivação de hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) que permite diminuir a velocidade de degradação, no entanto esta barreira não é suficientemente resistente em ambientes aquosos em que o Mg se degrada libertando iões Mg^{2+} de acordo com as reações (1.1) e (1.2). Em ambientes biológicos, estes processos intensificam-se e a degradação destes materiais torna-se mais rápida [15].



De acordo com as reações (1.1) e (1.2) a dissolução do Mg origina a emissão de hidrogénio para o meio resultando no aumento de pH da solução devido à acumulação de iões hidroxilos (OH^-). A reação entre os iões de Mg^{2+} e OH^- ocorre à superfície do material para formar um filme de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ estável em ambientes alcalinos (pH superior a 10.4), no entanto este filme, para ambientes neutros ou ácidos, torna-se instável apresentando uma baixa solubilidade precipitando à superfície do Mg. Esta é a principal razão da rápida degradação do Mg [5].

Os produtos resultantes da degradação de um implante de Mg são tolerados pelo organismo e são importantes pois participam em processos metabólicos vitais e mecanismos biológicos [16], incluindo a participação na homeostase óssea e mineral, promove a replicação e a transcrição do DNA e participa na regulação dos canais de iões [17]. Sendo por isso considerados não tóxicos. A dose recomendada destes iões para um adulto é entre 300 - 400 mg, sendo o restante excretado através de urina [18]. No entanto, a biocompatibilidade das ligas de Mg é determinada pela toxicidade dos iões metálicos constituintes das ligas e está associada também a variações de pH do meio biológico [18]. Deste modo, a elevada taxa de degradação em ambiente biológico torna-se assim uma desvantagem devido à elevada reatividade do Mg com o meio. A **Figura 1.2** representa a elevada taxa de degradação de um implante biodegradável de Mg. Quando o implante biodegradável se encontra em contacto com o meio biológico degrada-se rapidamente não acompanhando o período de formação do novo tecido ósseo conduzindo à perda da estabilidade mecânica do implante [6, 19]. A perda de estabilidade mecânica ocorre antes do período de regeneração óssea devido essencialmente a dois factores: à elevada taxa de degradação e à acumulação de hidrogénio em torno do implante resultante da degradação [16].

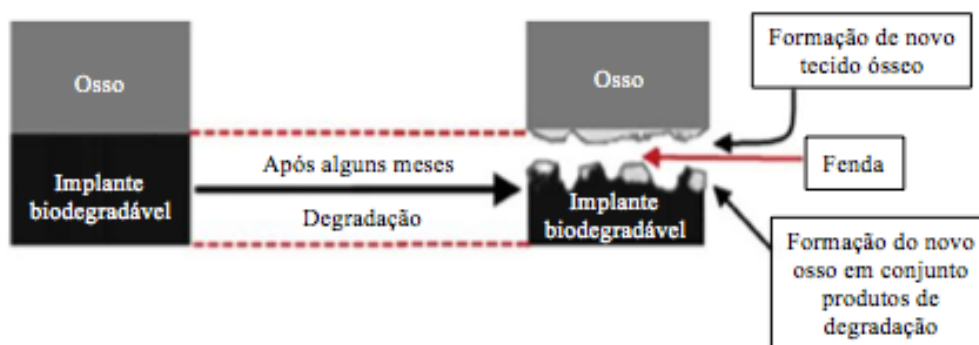


Figura 1.2: Representação da degradação do implante biodegradável (Mg) em meio biológico (adaptado de: [16])

Idealmente a funcionalidade do implante ósseo biodegradável requer um tempo de vida aproximado ao tempo de formação do novo osso. A **Figura 1.3** representa o tempo de vida ideal de um implante de Mg que se degrada de forma controlada permitindo a regeneração do tecido ósseo. O implante assegura a substituição temporária do osso enquanto ocorre a sua formação. O tracejado azul representa a resistência inicial do implante na ausência do osso. Com o decorrer do tempo aumenta a resistência do novo osso (linha vermelha) que se está a formar ao mesmo tempo que diminui a resistência do implante.

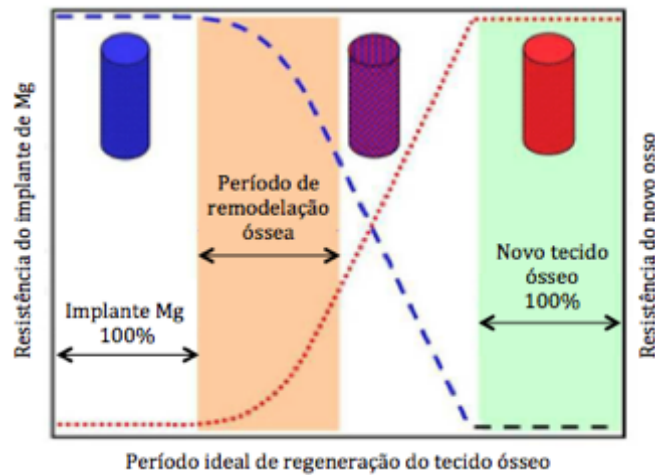


Figura 1.3: Representação do tempo de vida ideal do implante de Mg (adaptado de: [20])

No entanto, em aplicações ortopédicas torna-se difícil controlar esta elevada taxa de degradação do Mg que conduz à perda da integridade mecânica do implante e em simultâneo mantendo a biocompatibilidade [21]. Geralmente, é esperado que o implante biodegradável mantenha a sua integridade mecânica entre 12 a 18 semanas, enquanto ocorre o processo de regeneração óssea. Em seguida o implante deve degradar-se lentamente enquanto o novo osso substitui o implante [4]. A adição de elementos ao Mg permite aumentar a resistência à degradação e melhorar algumas propriedades mecânicas deste material sem comprometer a sua biocompatibilidade. Foi demonstrado que a adição de elementos como Al, Si, Sn, Zn ou Zr melhoram as propriedades mecânicas do Mg e reduzem a sua taxa de degradação em soluções fisiológicas [22].

Os fluídos corporais são complexas soluções salinas que contêm proteínas entre outros, estas soluções podem ser representadas através de soluções simuladoras de fluido corporal que ajudam a compreender os processos da degradação do Mg. Existem diversas soluções como: a solução de *Hanks*, solução tampão de fosfatos salino (PBS) e solução de fluido corporal simulado (SBF) que são utilizadas para estudar o comportamento do Mg e das suas ligas, nomeadamente a sua taxa de degradação. A taxa de degradação *in vitro* e *in vivo* das principais ligas de Mg utilizadas em aplicações ortopédicas encontram-se na **Tabela 1.2**.

Tabela 1.2: Taxa de degradação *in vitro* e *in vivo* de diferentes ligas de Mg [4]

Material	Taxa de degradação <i>in vitro</i> (mg/cm ² h)		Taxa de degradação <i>in vivo</i> (mg/mm ² ano)
	Solução de <i>Hanks</i>	SBF	
Mg puro	0,011	0,038	-
AZ31	0,0065	-	1,17
AZ91	0,0028	-	1,38
LAE442	-	-	0,39
WE43	-	0,085	1,56

A **Tabela 1.2**, permite verificar que em geral, a liga de Mg AZ31 é uma melhor opção para aplicações de implantes ósseos apresentando uma melhor resistência à degradação *in vitro* e uma boa resistência *in vivo*, quando comparada com o Mg puro e outras ligas de Mg. A literatura indica que nas ligas de Mg a taxa de degradação *in vivo* é quatro vezes inferior à taxa de degradação *in vitro* [23]. Para além disso, foi comprovado que a resistência à degradação da liga de Mg AZ91 aumenta quando se encontra imersa após 35 horas. O mesmo estudo conclui que a liga AZ31, quando imersa em solução de *Hanks* após 100 horas, aumenta a sua resistência à degradação devido à libertação dos produtos resultantes da degradação que formam à superfície das ligas de Mg uma barreira de proteção. Esta justificação foi confirmada através da medição do pH da solução que concluída a experiência foi detetado um aumento do pH para 11. Neste mesmo estudo foi ainda comparada a taxa de degradação entre a liga AZ91 e a liga AZ31 concluindo que a liga AZ31 apresenta uma resistência muito superior à liga AZ91 em todos os tempos de imersão [14]. Para além disso esta liga tem sido utilizada em diversas aplicações biomédicas [8, 9, 15]. A composição da liga de Mg AZ31 apresenta-se na **Tabela 1.3**.

Tabela 1.3: Composição da Liga de Mg AZ31 [24]

Composição (%)						
Al	Zn	Mn	Si	Cu	Ni	Fe
3,0500	0,8200	0,4000	0,0200	0,0030	0,0012	0,0023

O alumínio (Al) é um dos principais elementos constituintes da liga AZ31 (3%). A adição deste elemento ao Mg permite melhorar a resistência à degradação. Por outro lado, o zinco (Zn) é um elemento essencial já que se encontra presente em todo o organismo e quando é adicionado ao Mg também permite melhorar a resistência à degradação. É ainda um elemento facilmente absorvível pelas células. O manganês (Mn), um outro elemento presente na liga também tem a capacidade de aumentar a resistência à degradação [25].

Um aspecto muito importante a ter em conta num material destinado a um implante é a sua toxicidade. Os produtos resultantes da degradação do implante devem ser não tóxicos e facilmente absorvíveis pelos tecidos circundantes ou excretados através dos rins [26]. Existem indicações de toxicidade associada aos elementos que constituem as ligas de Mg. Biologicamente, o Al é conhecido como um elemento neurotóxico em elevadas doses. Por outro lado, o Zn em elevadas doses também é considerado um elemento neurotóxico e dificulta o desenvolvimento dos ossos. O mesmo é demonstrado para o Mn. No caso do Mg, para elevadas doses pode causar reações adversas ao organismo, como náuseas [27]. Estudos indicam que a toxicidade, proveniente dos iões de Mg, é relativamente baixa [24]. No entanto, outros estudos sugerem que os iões Mg não são tóxicos para o meio biológico e induzem o crescimento e a cicatrização dos tecidos [28]. Para além destes, podem ser incorporados outros elementos de ligas (como o Ni e o Cu) que podem provocar efeitos tóxicos no organismo quando o implante se degrada. Os limites de toxicidade de elementos constituintes das ligas de Mg encontram-se na **Tabela 1.4**. Esta tabela indica a dose máxima diária (em mg) de cada elemento constituinte de ligas de Mg, para o qual valores superiores a esta dose o elemento pode ser prejudicial.

Tabela 1.4: Limites de toxicidade de elementos constituintes das ligas de Mg [23]

Elemento	Dose máxima diária (mg)	Elemento	Dose máxima diária (mg)
Al	14	Nd	4,2
Be	0,01	Ni	0,6
Ca	1400	Pr	4,2
Cu	6	Sn	3,5
Fe	40	Sr	5
La	4,2	Ti	0,8
Zn	15	Y	0,016
Mg	400	-	-

Assim, torna-se importante a adição de elementos biocompatíveis para a constituição das ligas de Mg de modo a aumentar a resistência do implante ósseo que é sujeito a constantes esforços mecânicos. No entanto, a adição de elementos ao Mg não garante o controle desejado da elevada taxa de degradação do Mg. Deste modo, a superfície dos implantes pode ser alterada de forma a promover as condições necessárias para a sua estabilidade. Assim, são desenvolvidos revestimentos na superfície do implante para reforçar a biocompatibilidade e reduzir a taxa de degradação do Mg.

1.2 Tipos de Revestimentos aplicados no Magnésio e nas suas Ligas

De forma a permitir um controlo adequado da taxa de degradação do Mg em meio biológico é importante desenvolver então revestimentos para a superfície da liga de Mg que reduzam e controlem os mecanismos de degradação [16]. O desenvolvimento de revestimentos tem sido sugerido como estruturas que tenham a capacidade de controlar a taxa de degradação do implante, não induzindo reações adversas ao organismo [8]. A **Figura 1.4** representa a interação do implante biodegradável revestido, com os tecidos biológicos. É possível observar que após alguns meses ocorre a degradação do implante de forma controlada e em simultâneo ocorre a formação do novo tecido ósseo.

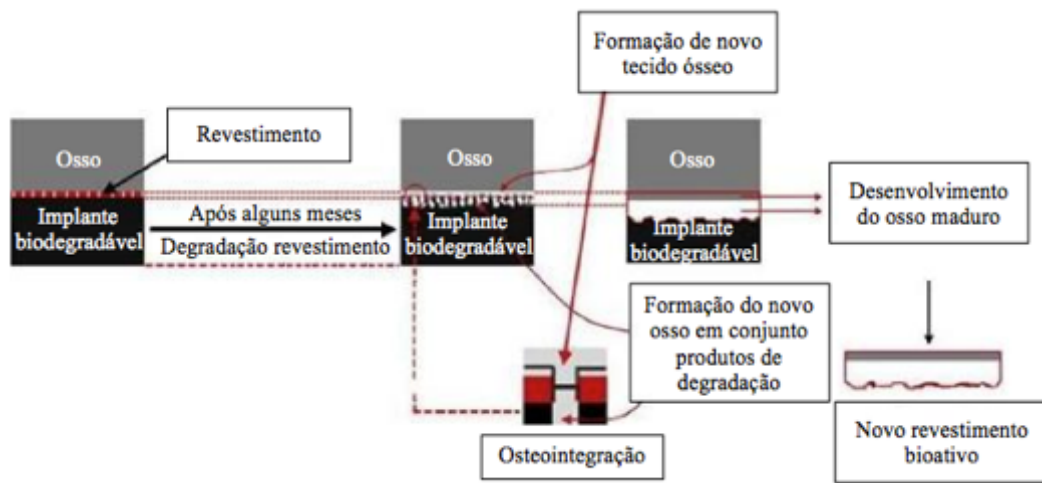


Figura 1.4: Representação esquemática do controlo da taxa de degradação através da aplicação de um revestimento (adaptado de: [16])

De acordo com a literatura, os revestimentos aplicados a implantes ósseos devem ter uma adequada porosidade, força de coesão, boa adesão ao substrato e estabilidade química [29]. Uma baixa porosidade permite obter uma superfície mais densa tornando-a mais resistente, é necessário uma adequada força de coesão para atração das moléculas e células presentes no meio biológico. A estabilidade química é importante devido ao meio biológico que é bastante instável, sendo assim é necessário que estes materiais não induzam reações adversas por parte do organismo e que apresentem uma elevada biocompatibilidade.

1.2.1 Revestimentos de Fosfatos

Os fosfatos têm sido considerados como um bom material para revestimentos de ligas de Mg. Para além da sua biocompatibilidade em aplicações biomédicas, tem também aplicações na indústria aeronáutica e automóvel [30].

No caso de aplicações biomédicas, estudos mostram que ocorre a formação de um filme uniforme e compacto sobre a superfície da liga de Mg AZ31 e que com o aumento da temperatura esse mesmo filme de fosfatos aumenta a resistência à degradação. Esses autores concluem que a formação deste filme inibe assim a dissolução da liga de Mg e restringe a evolução de hidrogénio melhorando a resistência à degradação [31, 32]. A literatura sugere que revestimentos de fosfatos presentes na superfície do implante da liga de Mg AZ31 permite diminuir a densidade de corrente na superfície em testes de degradação exibindo uma boa aderência à liga de Mg [31].

Os fosfatos de cálcio (CaP) têm sido também considerados uma boa opção para revestimentos na superfície do Mg e suas ligas pois são considerados como um bom substituto ósseo, sendo semelhantes à principal componente do osso revelando assim uma elevada biocompatibilidade com o tecido [6, 15, 19, 33].

1.2.2 Revestimentos de Nanopartículas de Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HAp) é um fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) de composição química semelhante à componente mineral do osso exibindo assim propriedades de elevada biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade promovendo a adesão celular e o crescimento ósseo [34]. Devido às suas propriedades osteogénicas a HAp tem diversas aplicações médicas, tais como: fabricação de revestimentos em implantes de uso em reconstrução maxilofacial, *scaffolds* para engenharia de tecidos e para aplicações dentárias e ortopédicas [35]–[37]. Tem sido aplicada como revestimento em substratos de ligas de Ti para aplicações ortopédicas de forma a melhorar a integração entre o implante e o tecido ósseo. No entanto, as suas propriedades mecânicas como: baixa resistência e baixa tenacidade à fratura da HAp pura limitam a sua utilização [36]. Alguns investigadores sugerem que a incorporação de óxido de grafeno reforça algumas propriedades mecânicas da HAp. Este estudo faz a comparação entre a HAp pura e o compósito HAp-1 wt%-rGO revelando que a adição deste composto no compósito exibe um crescimento substancial na dureza (25,8%), no módulo de elasticidade (47,6%) e na tenacidade à fratura (203%) [34]. A aplicação da HAp como revestimento em Mg puro e as suas ligas têm sido bastante estudada e com o desenvolvimento da nanotecnologia têm sido propostos diferentes métodos de revestimento de HAp como conversão química, anodização, eletrodeposição e sol gel [19]. De acordo com a literatura, as características da HAp utilizada em revestimentos influenciam as propriedades físico químicas do implante. Por exemplo, a pureza química da HAp deve ser tão elevada quanto possível ($\geq 95\%$), a razão CaP deve ser aproximadamente 1,67, a cristalinidade deve variar entre 50 – 90% não havendo consenso na literatura desta propriedade [29, 38].

Sabe-se que a cristalinidade é uma característica importante nos revestimentos de HAp. Recentemente foi considerada que uma fase amorfa ou menos cristalina da HAp pode ser mais solúvel em fluidos corporais e permite uma elevada taxa de dissolução o que pode conduzir a efeitos adversos a longo prazo e afetar o desempenho de um implante [29]. Além disto foi ainda estudado e demonstrado que a adesão e proliferação celular são superiores em revestimentos de HAp de elevada cristalinidade do que em revestimentos de HAp com uma estrutura amorfa [39]. Estes autores indicam que a baixa cristalinidade da HAp pode influenciar a progressão necessária para a proliferação celular e conduzir a uma resposta celular negativa. Recentes estudos revelam assim que a cristalinidade é um factor a ter em conta visto que poderá influenciar a resposta celular. Segundo a literatura, uma fase amorfa dos CaP permite obter uma rápida osteointegração sem a perda da sua estabilidade no revestimento [29]. Para tornar a estrutura amorfa dos CaP são realizados tratamentos térmicos aos revestimentos que por sua vez podem conduzir a uma maior atividade celular na superfície do revestimento [29].

1.2.3 Revestimentos com incorporação de Óxido de Grafeno

O grafeno tem sido considerado recentemente como um material promissor na área das ciências dos materiais. Desde a sua descoberta (1850) o grafeno tem causado enorme impacto em diversas áreas da ciência e tecnologia devido às suas propriedades físico químicas. Sendo as mais conhecidas: as boas propriedades electrónicas, excelente condutividade eléctrica e térmica, boas propriedades mecânicas como o seu módulo de elasticidade, fácil funcionalização biológica e química [34, 40]. O óxido de grafeno (GO) é um precursor da síntese do grafeno por processos de redução química, física ou térmica [40]. Para além da sua biocompatibilidade apresenta propriedades antibacterianas que são indispensáveis em implantes ortopédicos que pode prevenir o risco de infeções [36]. Basicamente o GO consiste numa monocamada com uma distribuição aleatória de grupos aromáticos e grupos oxigenados alifáticos que contêm grupos funcionais hidroxilos (OH^-), epóxidos ($>\text{O}$), carbonilos ($-\text{CO}$) e carboxilos ($-\text{COOH}$). Devido à sua estrutura e à existência de grupos funcionais oxigenados o GO exhibe excelentes propriedades electrónicas, óticas, térmicas mecânicas e eletroquímicas. A presença destes grupos existentes na sua constituição, conduzem a uma enorme variedade de aplicações, por exemplo os grupos funcionais polares conferem um carácter hidrofílico o que permite uma boa dispersão do GO em água ou solventes [40]. Outra das vantagens destes grupos funcionais é que permite a modificação ou funcionalização química com outros materiais orgânicos ou inorgânicos que têm a capacidade de alterar as suas propriedades dependendo da sua função [40].

Pressupõe-se que a redução térmica do GO remove os grupos oxigenados, no entanto, experimentalmente após tratamentos térmicos para reduzir o GO verifica-se ainda a existência de grupos oxigenados [40, 41]. A **Figura 1.5** representa a estrutura química do grafeno, do óxido de grafeno e do óxido de grafeno reduzido (rGO).

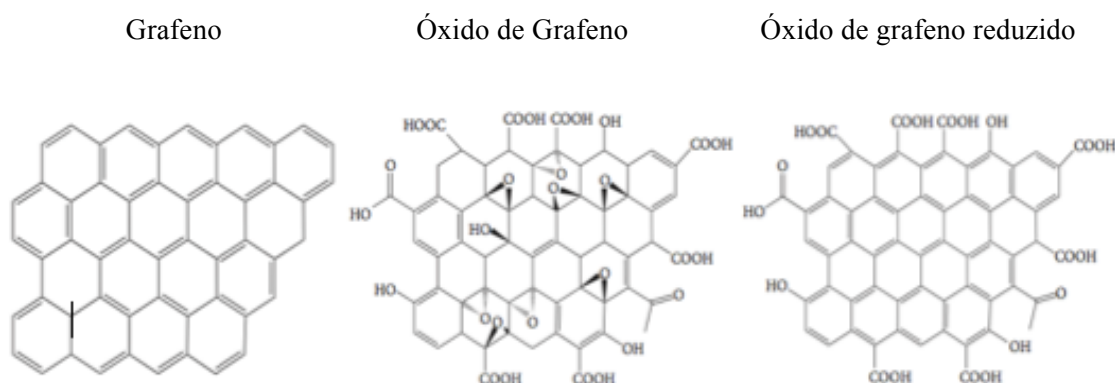


Figura 1.5: Estrutura química do grafeno, GO e rGO (adaptado. de [42])

Por outro lado, o rGO é considerado como um potencial material com várias aplicações como células fotovoltaicas, supercondensadores, sensores e baterias [43], [44]. No entanto a redução térmica do GO é complexa a nível estrutural devido à energia envolvida no processo que remove as moléculas de água intercaladas, nos grupos hidroxilos e epóxidos [44]. Em aplicações biomédicas tanto o grafeno como os seus derivados GO e rGO tem-se revelado materiais em crescente evolução. Desde 2008, investigadores têm realizado importantes estudos para potenciais aplicações biomédicas como por exemplo: biossensores, sistemas de libertação controlada de fármacos e sistemas com efeitos antibacterianos que tornam o GO um material muito promissor. No entanto, a biocompatibilidade é um factor essencial para o uso do GO em aplicações biológicas, onde ocorre o contacto do material com tecidos biológicos, por isso muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a biocompatibilidade do GO. No caso de implantes ósseos, têm sido realizados vários estudos com revestimentos de grafeno e com os seus precursores: GO e rGO, no qual todos apresentam boas respostas biológicas bem como melhoram as suas propriedades mecânicas do substrato. Por exemplo, *N. Dubey* e seus colaboradores, através de uma revisão da literatura indicam que o compósito GO-CaP exibe uma osteocondutividade superior em relação a estes materiais individuais. Outro compósito indicado por estes autores é a adição de GO ao revestimento de HA que exibe uma elevada resistência à degradação quando comparado a um revestimento de HA pura.

Além disso, este revestimento (GO/HA) permite melhorar a resposta celular em comparação com um substrato de Ti.

No caso do Ti revestido com GO apresenta uma maior osteocondutividade em relação ao Ti não revestido [42]. *C. Zhao* estudou a aplicação de um revestimento de GO e HA num substrato de quartzo para reparações ósseas e verificou que o composto neste substrato apresentou uma excelente biocompatibilidade *in vitro* tornando o GO um material promissor para melhorar a funcionalidade de implantes ósseos [45]. *M. Li* e seus colaboradores desenvolveram um revestimento de HA/rGO sobre uma superfície de Ti através do método de eletroforese. Estes autores demonstraram que este revestimento reforça as propriedades mecânicas aumentando a resistência à degradação e têm uma elevada biocompatibilidade *in vitro* [36].

Outros estudos desenvolvidos por *C. Santos et al.* permitem reforçar que o revestimento GO-HA em substratos de Mg permite obter melhores propriedades mecânicas tornando o processo da degradação do Mg mais lento em soluções fisiológicas [46].

Um outro aspeto muito importante a considerar em implantes ósseos é a toxicidade que tem sido recentemente estudada, revelando-se controversa na literatura. Diversos estudos apontam que a toxicidade do GO é dependente da concentração [36, 45], por um lado, *M. Li* e colaboradores indicam que o GO induz toxicidade em células específicas como fibroblastos da pele para concentrações superiores a 50 µg/ml entrando em controversa com outros autores que consideram o GO biocompatível para as mesmas concentrações [47]. *A. Seabra et al.* propõem ainda, que as espécies reativas do oxigénio do GO possam ser responsáveis pelo seu efeito tóxico [48]. Verifica-se que existe ainda muita controvérsia em torno da toxicidade do GO, no entanto, parece ser um material muito promissor para aplicações biomédicas, nomeadamente para implantes ósseos.

Tendo em conta todas estas propriedades dos materiais utilizados em revestimentos para a superfície do implante de Mg é importante utilizar métodos apropriados para depositar estes revestimentos na superfície do Mg e nas suas ligas.

1.2.4 Métodos de deposição dos revestimentos em substratos de Mg e suas Ligas

Existem vários métodos para depositar revestimentos no Mg e suas ligas, entre eles, conversão química, anodização, eletrodeposição/eletroforese, sol gel entre outros [19]. A eletrodeposição e eletroforese são dois processos para depositar nano e micro partículas em suspensão em substratos condutores. São duas das técnicas mais utilizadas para depositar revestimentos em substratos metálicos como o Mg por ser um processo simples, económico e ecológico. Permite ainda ajustar parâmetros como o tempo da deposição bem como o potencial aplicado de forma a obter uma elevada taxa de deposição numa elevada área com uma boa uniformidade do depósito [36, 49]. Mais especificamente as técnicas consistem:

- A eletrodeposição (ED) é uma técnica que permite a deposição de um revestimento, sob ação de uma corrente elétrica, num substrato metálico através de uma solução eletrolítica. Nomeadamente este processo é designado para iões como os fosfatos (PO_4^{3-}) que são dissolvidos em solução tornando-a eletrolítica (condutora) permitindo a sua deposição num substrato [27].
- A deposição por eletroforese (EDP) é uma técnica (**Figura 1.6**) que permite a ligação entre um revestimento e um substrato. Este processo baseia-se na aplicação de um potencial na superfície do substrato obrigando à migração das partículas carregadas em suspensão em direção à superfície do substrato metálico. Este processo é muito utilizado para produzir revestimentos sobre superfícies metálicas [50].

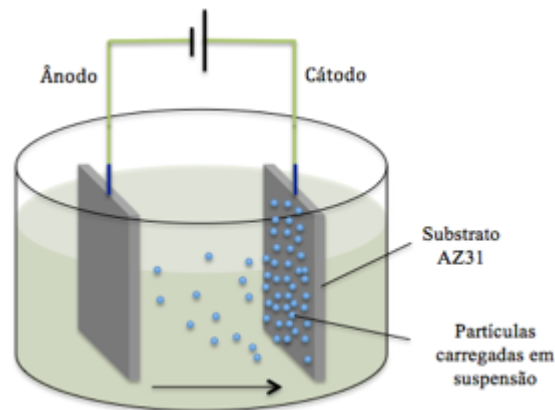


Figura 1.6: Representação do processo de deposição por eletroforese

1.3 Efeito do tratamento térmico dos revestimentos na resposta biológica

Os tratamentos térmicos são realizados para modificar a estrutura de materiais. No caso dos revestimentos, diversos autores sugerem numa revisão da literatura que a realização de tratamentos térmicos melhoram significativamente a resistência à degradação do Mg, em ambientes biológicos, quando comparado com superfícies não tratadas termicamente [4, 51]. Estudos realizados por *A. Asami et al.* demonstraram que o tratamento térmico na estrutura da HAp tem um efeito positivo na diferenciação de osteoblastos. Estes autores verificaram ainda que algumas propriedades da HAp, nomeadamente o tamanho das partículas, a sua cristalinidade e a solubilidade, são influenciadas por tratamentos térmicos que podem induzir a formação de novo osso reduzindo assim o tempo de regeneração do tecido [52].

Outros estudos avaliaram a resposta celular a *scaffolds* de biocerâmicos β -TCP revestidos com GO e sujeitos a tratamento térmico. Os autores concluíram que a aplicação do tratamento térmico a este revestimento estimula a proliferação e diferenciação de células hBMSCs. Além disso, demonstraram que o compósito GO/ β -TCP acelera *in vivo* a formação do tecido ósseo [53]. As conclusões destes estudos, *in vitro* e *in vivo* permitem prever um tratamento clínico mais eficiente na regeneração do tecido ósseo baseado na utilização do Mg com os tratamentos adequados aplicados à sua superfície. Em geral, a literatura sugere que a alteração da estrutura de revestimentos que decorre de tratamentos térmicos tem um impacto importante na resposta celular. Para além de poderem melhorar a resposta celular, estes tratamentos podem tornar mais lento o processo de degradação do Mg o que vai de encontro a dois dos objetivos deste trabalho.

1.4 Comportamento *in vitro* e *in vivo* do Magnésio e seus revestimentos

Diversos estudos têm sido realizados às ligas de Mg caracterizando a sua estrutura, processo de degradação, propriedades mecânicas e biocompatibilidade. Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a biocompatibilidade e a osteocondutividade do Mg. Investigações *in vivo* envolvem a implantação de dispositivos de fixação, produzidos a partir de ligas de Mg em tíbias, ulnas e fêmures de coelho e rato. A implantação destes dispositivos demonstraram através de tomografia computacional, testes mecânicos e análise histológica que as ligas de Mg degradam-se sem causar efeitos adversos e induzem a osteointegração no local da implantação [8]. A.Chaya e colaboradores avaliaram *in vivo* a degradação de implantes de fixação de Mg concluindo que a degradação destes dispositivos não inibe o período de regeneração e induz a formação do novo osso em torno do implante. Neste mesmo estudo, foi ainda acompanhada a formação do novo osso tendo-se verificado um papel importante do Mg na diferenciação celular e crescimento do tecido [8].

Análises da resposta biológica *in vitro* a ligas de Mg têm focado na análise da viabilidade e proliferação celulares. Nestas análises foram usados testes colorimétricos (ensaios MTT e WST-1) para mostrar que as ligas de Mg são citocompatíveis com células estaminais mesenquimais humanas primárias (MSCs), células derivadas do osso, fibroblastos de ratos, células do osteossarcoma humanas MG-63, macrófagos RAW264.7 e osteoblastos MC3T3-E1 [2]. Estudos realizados mostram através de uma revisão da literatura, que quer em ensaios em que as células são expostas a baixas concentrações de produtos de degradação de Mg (testes de extracto), quer em ensaios em que as células foram cultivadas diretamente em ligas de Mg (sujeitas a degradação contínua), foi verificada citocompatibilidade [8].

A adesão de osteoblastos é um pré-requisito essencial para a sua atividade: proliferação, síntese de proteínas (proteínas da matriz extracelular) e formação de depósitos minerais. A adesão das interações que se estabelecem entre as células e o material é condicionada pela topografia da superfície. Quando é aplicada em revestimentos, a HAp tem um papel fundamental na interação das células ósseas com o substrato promovendo a sua adesão e proliferação, o que conduz à osteointegração do implante. Têm sido realizadas investigações que indicam que estruturas de HAp combinadas com iões de Mg induzem a mineralização de tecidos calcificados [54, 55]. Num estudo, em que foi aplicado um revestimento compósito de HAp/GO num substrato de Ti, verificou-se que a presença de GO no compósito promoveu ou não prejudicou a proliferação de células L929 e MG-63 relativamente ao revestimento com HAp pura [36]. Concluiu-se desta pesquisa, que este compósito é uma excelente opção para aplicações biológicas combinando a biocompatibilidade com a melhoria significativa das propriedades mecânicas. Estes estudos são importantes particularmente para o desenvolvimento de implantes ósseos com revestimentos de GO capazes de promover mecanismos celulares importantes conduzindo à diminuição do tempo de regeneração do novo tecido ósseo [56].

Neste trabalho pretendeu-se funcionalizar a superfície da liga de Mg AZ31 depositando, através das técnicas de eletroforese e eletrodeposição, um revestimento que permita induzir a adesão e proliferação celulares ao mesmo tempo que controle a elevada taxa de degradação do material. As superfícies revestidas foram caracterizadas e foram também analisadas no que diz respeito à resposta de osteoblastos semeados sobre elas.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados em todo o procedimento experimental. Inicialmente é abordado todo o procedimento experimental usado no desenvolvimento dos revestimentos e também são apresentadas as técnicas de caracterização. Por fim, é descrita a parte experimental relativa às culturas de células na superfície dos revestimentos.

As experiências laboratoriais para o desenvolvimento dos revestimentos biocompatíveis e osteoindutores foram realizadas na Escola Superior de Tecnologia do Instituto Politécnico de Setúbal. Relativamente à resposta biológica, os ensaios celulares foram realizados na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

2.1 Preparação dos revestimentos multifuncionais

Para este trabalho foi utilizada uma Liga de Magnésio AZ31 comercial. A liga AZ31 (*Goodfellow*) foi cortada em discos de diâmetro de 25,5 mm como mostra a **Figura 2.1** e foi utilizada como substrato. A composição química da liga AZ31 encontra-se na **Tabela 2.1** onde é possível verificar que é maioritariamente constituída por uma mistura de 3% de Al e aproximadamente 1% de Zn.



Figura 2.1: Amostras da liga de Mg AZ31 utilizadas como substrato

Tabela 2.1: Composição da Liga de Mg AZ31

Elemento	Al	Zn	Mn	Si	Cu	Ni	Fe
(wt %)	3,05	0,82	0,40	0,02	0,003	0,0012	0,0023

A superfície das amostras da liga AZ31 foram polidas com lixas de silicone de tamanho de grão entre P400 – P4000. O polimento foi realizado de modo a diminuir a rugosidade deixada pelo corte e assim conseguir-se obter uma superfície mais homogênea e com o mínimo de rugosidade possível. Após o polimento as amostras foram limpas em etanol e colocadas em ultrassons para remover resíduos presentes na superfície que possam influenciar o processo da deposição do revestimento. Por fim as amostras foram secas.

2.1.1 Eletrólito

A solução do eletrólito para a deposição eletroquímica foi preparada de acordo com o procedimento desenvolvido por *C. Santos et al.* [46], dissolvendo 0,06 M de hidrogeno fosfato de diamónio ($\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$) em água destilada. O pH da solução de fosfatos foi ajustado com hidróxido de potássio (KOH) até um de pH 10 [46]. A necessidade de ajustar o pH do eletrólito deve-se ao facto da superfície da liga de Mg AZ31 em contacto com o eletrólito encontrar-se na região de passivação, ou seja, a este pH (10) ocorre a formação de um filme de passivação que “protege” a superfície da liga metálica [46].

2.1.2 Síntese das nanopartículas de Hidroxiapatite

As nanopartículas de HAp foram obtidas por método hidrotermal, descrito por *C. Santos et al.* [35]. Foi adicionado ácido cítrico com nitrato de cálcio tetrahidratado e hidrogenofosfato de amónia até obter uma solução a pH 8. A solução foi colocada em autoclaves a 180 °C durante 24 h. De seguida as partículas foram filtradas por vácuo com um filtro de membrana de 47 mm de diâmetro e tamanho de poro 0,22 µm e por fim deixou-se secar num excicador. As partículas obtidas foram depois dispersas na solução do eletrólito previamente preparado.

2.1.3 Deposição Eletroquímica

Foram realizados três tipos de deposições na superfície da Liga de Mg AZ31: Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO. A deposição de cada revestimento foi realizada numa célula eletroquímica de configuração de três eléctrodos em que a liga AZ31 é usada como eléctrodo de trabalho (cátodo). A platina atua como contra-eléctrodo (ânodo), é utilizada como um material inerte às reações químicas que ocorrem durante a deposição e encontra-se posicionada em frente à amostra para conduzir as partículas carregadas/iões em suspensão em direção à superfície do substrato (liga AZ31). Este eléctrodo assegura que as reações químicas envolvam apenas o eléctrodo de trabalho e o eletrólito que fecha o circuito eléctrico. O eléctrodo saturado de calomelanos (SCE) é usado como eléctrodo de referência para monitorizar o potencial na solução. É ainda de realçar que neste eléctrodo não circula corrente uma vez que a entrada para o eléctrodo de referência do potencióstato é de alta impedância. Esta característica garante que o fluxo eléctrico durante a experiência ocorra apenas entre o eléctrodo de trabalho e o contra eléctrodo. A distância entre os eléctrodos foi mantida constante.

Para a deposição dos revestimentos foi aplicado um potencial de 1 V através de um potencióstato (*CHI 760C (CH Instruments, USA)*) e cada deposição teve uma duração de 2 horas. O equipamento de eletrodeposição utilizado encontra-se representado na **Figura. 2.2a**, onde se observa a montagem geral do sistema de eletrodeposição e a **Figura 2.2b** ilustra a célula eletroquímica onde decorre o processo de deposição dos revestimentos.

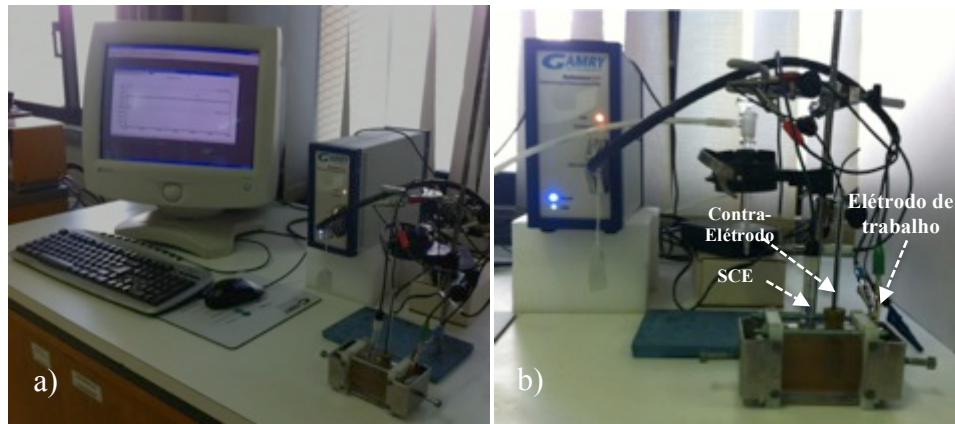


Figura 2.2: a) Montagem do processo de eletrodeposição química b) célula eletroquímica para ensaio de deposição dos revestimentos

Para seleção das condições de deposição, foi feita uma modificação na quantidade de HAp e no potencial de deposição relativamente ao que foi descrito no trabalho publicado por C. Santos e colaboradores [46]. Deste modo, para as soluções dos eletrólitos, foi utilizada uma concentração de 0,06 M de Fosfatos e para os restantes eletrólitos, foram incorporadas 0,09 g de partículas de HAp e por fim foi adicionado 1 ml de GO com uma concentração de 4 mg/ml. Foi exposta uma área de $1,7 \text{ cm}^2$ da Liga AZ31 a 100 ml de eletrólito. Assim, a liga de Mg AZ31 foi colocada em contacto com cada um dos eletrólitos e foi mantida em potencial de circuito aberto (OCP) até o sistema estabilizar. Foi realizado um pré-ensaio de curvas de polarização (**Figura 2.3**) para identificar qual o potencial mais adequado a aplicar na deposição dos revestimentos. O ensaio foi realizado a pH 10, a temperatura ambiente e sujeito a um varrimento do potencial elétrico no sentido positivo.

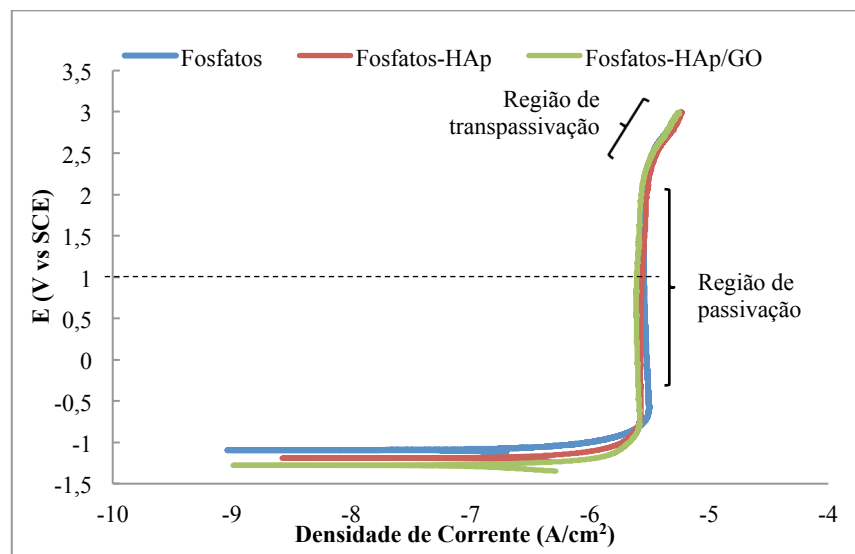


Figura 2.3: Curvas de polarização para os três diferentes eletrólitos

Através da **Figura 2.3** que mostra as curvas de polarização obtidas para os diferentes eletrólitos: Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO foi permitido concluir qual a região de passivação para os diferentes eletrólitos. Esta região é importante pois permite definir uma gama de potenciais que podem ser utilizados para a deposição originando um depósito estável na superfície da liga de Mg AZ31. A região de passivação corresponde à formação de um filme que protege a superfície do metal [10]. Assim, pelo gráfico da **Figura 2.3** optou-se por realizar o processo de deposição eletroquímica aplicando um potencial de 1 V para todos os eletrólitos durante cerca de 2 horas. Após a deposição eletroquímica obteve-se os seguintes revestimentos: Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO que se encontram representados na **Figura 2.4**.

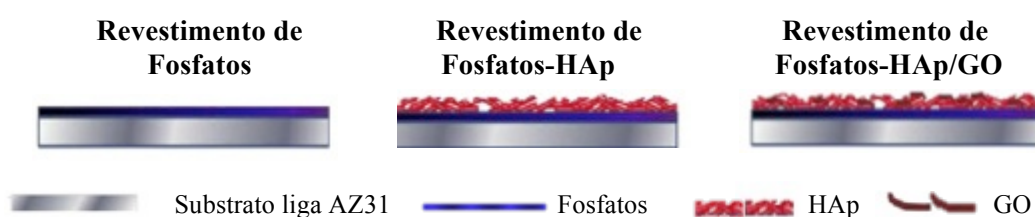


Figura 2.4: Diferentes revestimentos depositados no substrato da Liga de Mg AZ31 (adaptado: [36])

Os ensaios eletroquímicos de deposição de revestimentos permitem obter informações sobre as correntes elétricas que interagem com a superfície do material exposta ao eletrólito. Pretende-se assim obter correntes elétricas baixas na ordem dos micrómetros ou idealmente na ordem de grandeza dos nanómetros, ou seja, quanto mais baixas forem as correntes mais protetor será o revestimento depositado na superfície do material.

2.1.4 Tratamento Térmico

Após a deposição dos diferentes revestimentos, foi realizado um tratamento térmico para modificar a estrutura dos revestimentos e melhorar a resposta biológica. Assim serão comparados os revestimentos com tratamento e sem tratamento térmico. Foram colocadas as amostras no forno a uma atmosfera de gás azoto durante 30 minutos de modo a conseguir-se reduzir o GO para grafeno e assim ter-se um revestimento mais biocompatível [42]. De seguida colocou-se as amostras a uma temperatura de 300 °C durante 10 minutos e o aquecimento foi feito a 10 °C/min. O tratamento térmico foi realizado num forno tubular, como se encontra representado da **Figura 2.5**.



Figura 2.5: Forno tubular para tratamento térmico dos revestimentos

2.2 Ensaios de degradação em condições fisiológicas

2.2.1 Solução simuladora de fluido corporal

De modo a simular o comportamento dos revestimentos no corpo humano, foi preparada uma solução simuladora de fluido corporal (SBF) para realizar testes de degradação em condições fisiológicas (temperatura constante de 37,5 °C e pH 7,4). A solução foi preparada de acordo com o método de *Kokubo et al.* [57] em que a concentração de iões encontra-se na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2: Concentração de iões presentes na solução SBF [57]

Ião	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	HCO ³⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
(mM)	142,0	5,0	1,5	2,5	4,2	147,8	1,0	0,5

2.2.2 Degradação fisiológica

Os ensaios de degradação em condições fisiológicas permitem simular o comportamento dos materiais em meio biológico. Torna-se assim importante avaliar a degradação dos diferentes revestimentos para prever o seu comportamento *in vitro*. Assim, os revestimentos: Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO e os revestimentos tratados (300 °C, 10 min): Fosfatos-t, Fosfatos-HAp-t e Fosfatos-HAp/GO-t foram submetidos a ensaios de degradação em condições fisiológicas. Este ensaio consiste numa área de 1 cm² dos revestimentos exposta à solução de SBF com uma temperatura constante de 37,5 °C e pH 7,4.

Os revestimentos foram mantidos em OCP durante 800 s de modo a estabilizar o sistema antes da degradação e de seguida aplicou-se um varrimento do potencial elétrico no sentido positivo, na ordem de grandeza dos volts para acelerar a degradação dos revestimentos. A realização deste ensaio permite monitorizar as correntes elétricas e o potencial aplicado, através das curvas de polarização potenciodinâmicas. Pretende-se assim obter correntes elétricas o mais baixo possível que correspondem a revestimentos mais “protetores”. É ainda importante referir que este ensaio corresponde a uma degradação forçada dos revestimentos visto que os potenciais elétricos que circulam no corpo humano são da ordem dos mV. É importante referir que estes testes são acelerados e não tem em consideração as proteínas constituintes do fluido biológico que também têm um papel fundamental na degradação dos revestimentos.

2.3 Técnicas de caracterização dos revestimentos

As técnicas de caracterização são importantes para avaliar as propriedades físico químicas dos materiais constituintes dos revestimentos. Torna-se assim essencial conhecer a estrutura morfológica da superfície, a espessura, topografia, a cristalinidade e a molhabilidade, bem como analisar quimicamente a sua composição. Estas informações são relevantes e determinantes para compreender a biocompatibilidade dos revestimentos *in vitro*.

2.3.1 Microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM)

A microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM) é uma técnica de caracterização que permite analisar a morfologia e composição química de materiais. Esta técnica utiliza um feixe de eletrões que varre a superfície da amostra permitindo obter imagens tridimensionais de elevada resolução, com uma elevada gama de ampliação e uma grande profundidade de campo. A esta técnica tem acoplada uma espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS) que permite obter mapas e espectros de composição química dos elementos na superfície das amostras. O princípio de funcionamento do FEG-SEM consiste na emissão termiônica de um feixe de eletrões proveniente de um filamento de tungsténio (cátodo) que é acelerado em direção ao ânodo com uma diferença de potencial entre 1 e 50 kV. Este feixe é controlado por um diafragma e focalizado por um conjunto de lentes condensadoras que passa através de pares de bobinas de varrimento e lentes objetivas que deflectem o feixe permitindo o varrimento sobre a amostra. A **Figura 2.6** representa o SEM e a respetiva coluna do microscópio onde decorrem estes processos que permitem o varrimento da amostra.

Quando ocorre a interação entre o feixe de elétrons e a amostra a analisar, ocorrem diversos tipos de sinal como elétrons secundários, elétrons de Auger, elétrons retrodifundidos e raios-X característicos que são captados e amplificados obtendo um sinal elétrico que forma a imagem. São estes sinais que permitem caracterizar a microestrutura, topografia e composição da superfície da amostra. Os sinais mais relevantes para a formação de imagem são originados por elétrons secundários que permitem obter imagens de alta resolução e por elétrons retrofundidos que possibilitam uma maior resolução. A composição química da amostra é fornecida pelos raios – X característicos emitidos. O vácuo é necessário para que o feixe não sofra qualquer tipo de interação antes de chegar à amostra [58].

Para caracterizar os revestimentos, procedeu-se à aquisição de imagens de FEG-SEM através do equipamento JEOL 7001F-FEG-SEM (REEQ/711/CTM/2005) com uma tensão de aceleração de 15 KV disponível no *MicroLab, Eletron Microscopy Laboratory* do Instituto Superior Técnico (IST). Para a observação de células em SEM foi necessário cobrir as amostras de Mg, Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t com uma liga de ouro-paládio para obter um melhor contraste nas imagens e tornar a superfície das amostras mais condutora.

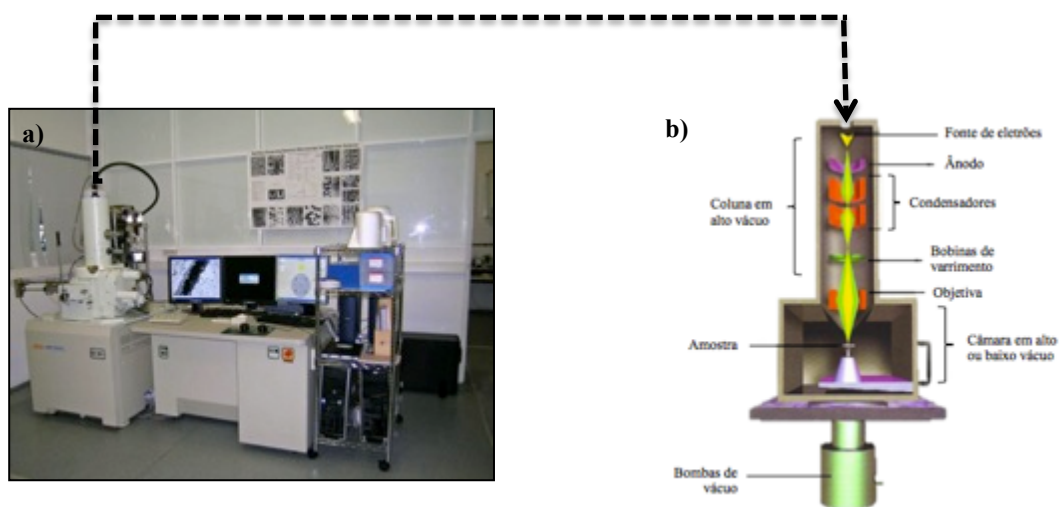


Figura 2.6: a) Microscópio electrónico de varrimento ICEMS-IST e b) representação da coluna FEG-SEM [59]

2.3.2 Microscopia electrónica de transmissão (TEM)

A microscopia electrónica de transmissão (TEM) é outra técnica de caracterização de grande ampliação e resolução na ordem dos 0,23 nm. O princípio de funcionamento do TEM consiste na emissão termiônica de um feixe de elétrons que é acelerado num tubo sob alto vácuo em direção à amostra a analisar com potenciais que variam entre 100 kV e 1000 kV.

É importante que as amostras estejam estáveis sob alto vácuo para que o feixe de eletrões seja transmitido. O feixe de eletrões interage com a amostra originando diversos sinais como radiação (raios-X característicos), eletrões secundários, eletrões retrofundidos e eletrões transmitidos. São estes tipos de sinais que são utilizados na formação da imagem. O feixe de eletrões transmitido incide sobre uma tela fluorescente, um filme fotográfico ou uma câmara de vídeo gerando a imagem. É possível obter imagens da superfície do material, analisar defeitos, nanopartículas, avaliar filmes finos bem como contornos de grãos, avaliar a recristalização e identificar composição de fases. Existem dois modos de operação do TEM: (1) obtenção da imagem possibilitando análises estruturais e morfológicas e (2) permite analisar os padrões de difração de eletrões para avaliar as fases cristalinas. A preparação da amostra consiste na preparação sobre uma grelha de cobre, onde incide o feixe de eletrões que origina a imagem [60]. A **Figura 2.7** representa o microscópio e a respetiva coluna.

Para a caracterização dos revestimentos foi utilizado um equipamento *Hitachi* modelo H-8100-II com uma tensão de aceleração de 200 kV disponível no *MicroLab, Eletron Microscopy Laboratory* do IST. Procedeu-se à aquisição de imagens de TEM do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t (300 °C, 10 min) para análise da morfologia da superfície, forma das nanopartículas de HAp e estrutura cristalina por difração de eletrões. Para a preparação das amostras foi recolhido uma pequena quantidade de revestimento e foi colocado numa grelha perfurada de cobre revestida com uma película de formvar. Posteriormente inseriu-se a grelha no microscópio para observar.

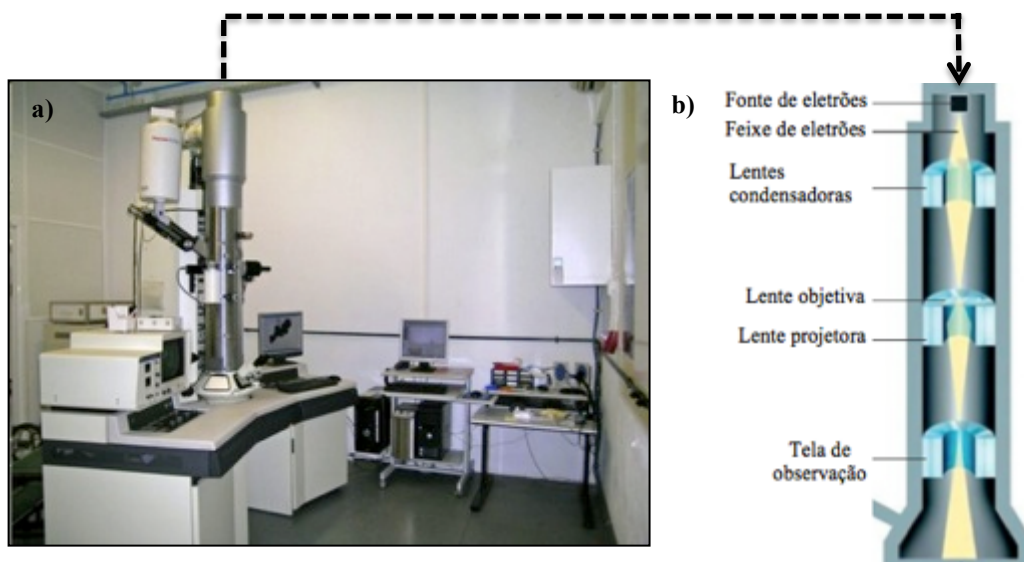


Figura 2.7: a) Microscópio electrónico de transmissão no IST b) representação da coluna do TEM [61]

2.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica de caracterização que permite analisar a topografia tridimensional da superfície das amostras e as forças de adesão. Permite obter imagens tridimensionais reais da superfície topográfica com uma elevada resolução espacial. O AFM é constituído por três elementos (**Figura 2.8**): Um piezoelétrico que permite o movimento nas três direções do espaço (x, y, z), uma ponta fina de silício (*tip*) que interage com a superfície da amostra e um sistema que permite a detecção do posicionamento do braço (laser e fotodetector). A ponta efetua o varrimento da superfície da amostra que interage com a sua estrutura atômica permitindo a deflexão do braço. A topografia da superfície da amostra é obtida pelo deslocamento da ponta que deteta cada posição da superfície obtendo imagens tridimensionais. Esta técnica permite ainda determinar parâmetros de rugosidade da amostra. O AFM opera em dois modos: o modo contacto que se caracteriza por ser estático em que não há oscilações no varrimento e o modo dinâmico que permite oscilações do braço [62].

Foi utilizado um AFM da *Veeco*, modelo CP-II, disponível no IST para análise da topografia dos revestimentos: Fosfatos-HAp, Fosfatos-HAp-t, Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t.

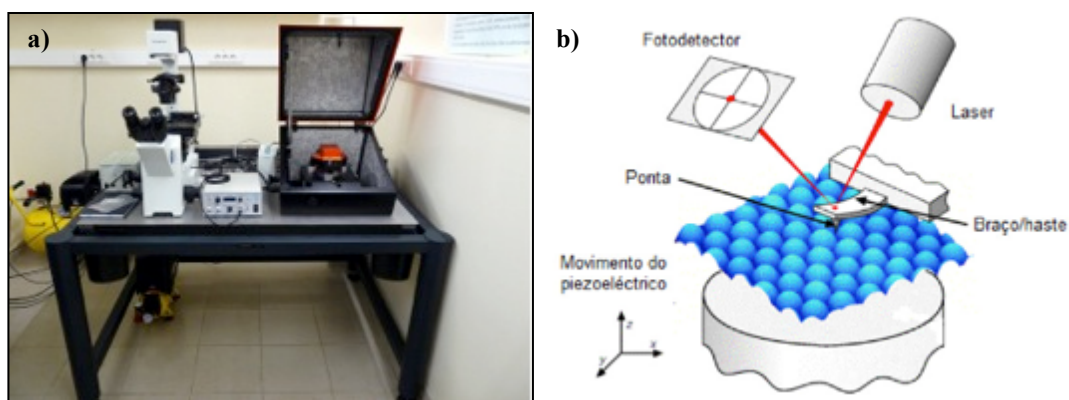


Figura 2.8: a) Microscópio de força atômica IST b) representação dos componentes [63]

2.3.4 Difração de Raio-X (DRX)

A difração de raio-X (DRX) é uma técnica não destrutiva que permite caracterizar a estrutura cristalina de materiais. O princípio de funcionamento da técnica consiste na difração de raios-X pelas fases cristalinas do material seguindo a lei de *Bragg* (2.1):

$$\lambda = 2d \sin\theta \quad (2.1)$$

Em que λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre os planos cristalográficos hkl (índices de *Miller*) da estrutura cristalina, θ é o ângulo de incidência da radiação. Através da lei de *Bragg* é possível obter a relação entre a posição angular da difração do feixe e o comprimento de onda do feixe incidente (Raios-X) e da distancia entre os planos cristalográficos.

A radiação incide sobre a amostra ocorrendo dispersões elásticas. Após a colisão entre o fóton e os elétrons ocorre uma mudança da sua trajetória, mantendo a mesma energia e a mesma fase do fóton incidente [64] (**Figura 2.9**).

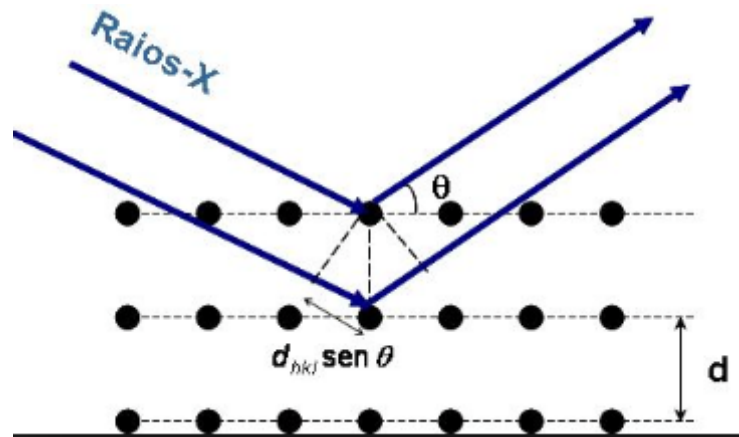


Figura 2.9: Ilustração da lei de *Bragg* para a difração de Raios-X [65]

Foram caracterizados os revestimentos: Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t (300 °C, 10 min) por difração de raios-X usando a configuração rasante. Para as análises de DRX recorreu-se ao Difratômetro de Raios-X, do laboratório de nanofabricação do Cenimat-I3N na FCT/UNL, *X'PerPRO* da *PANalytical*, equipado com uma ampola de Cu (c.d.o. 1.5418 *Angstroms*) alimentada a 45kV e 40 mA e usando um detector linear *X'Celerator*. As análises foram realizadas na configuração feixe paralelo ou geometria rasante (GIXRD) (colocando o detector rodado a 90°) e foram efectuados varrimentos 2θ entre 8° e 65° e com um passo de 0.1° em 2θ , para um valor do ângulo de incidência $\omega = 2^\circ$.

2.3.5 Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto ou molhabilidade é uma medida importante na caracterização de uma superfície pois determina um comportamento hidrofílico ou hidrofóbico em ambiente biológico. A importância desta característica permite avaliar de uma forma indireta o comportamento das moléculas biológicas na presença do implante. Assim uma superfície é hidrofílica quando o ângulo de contacto é inferior a 90° , a gota fica espalhada sobre a superfície ocupando uma determinada área. Para superfícies hidrofóbicas o ângulo de contacto é superior a 90° sendo a gota redonda (**Tabela 2.3**). A molhabilidade é uma medida de um ângulo formado entre uma recta tangencial de uma gota de água e uma superfície sólida como ilustra a **Figura 2.10**.

Tabela 2.3: Diferentes graus de molhabilidade [66]

Regime	Super-hidrofílico	Hidrofílico	Hidrofóbico	Super-hidrofóbico
Diagrama da gota				
Ângulo de contacto	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$

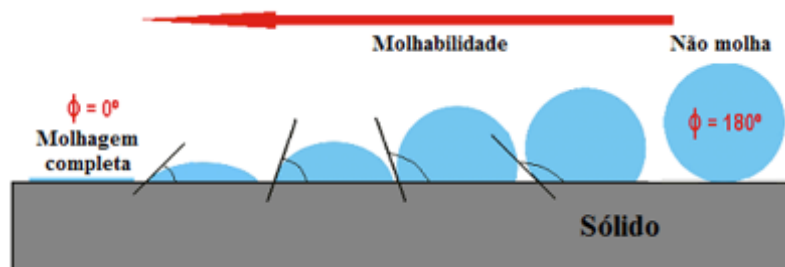


Figura 2.10: Representação da medida do ângulo de contacto [67]

Antes das medições do ângulo de contacto, os revestimentos ficaram em vácuo durante 24h para remover todas as moléculas de água da superfície. De seguida posicionou-se a amostra na câmara e através de uma microseringa posicionada perpendicularmente à superfície da amostra colocou-se uma gota de $30\ \mu\text{L}$ de água desionizada sobre a superfície a analisar. As medidas foram adquiridas usando uma câmara de vídeo conectada a um sistema óptico ligado a um detetor de imagens no IST. A aquisição e análise de imagem foram realizadas durante 30 s após espalhar a gota a uma temperatura ambiente. Foi utilizado o *software Matlab* para processamento de dados. Foram realizadas três medições para cada amostra com 10 s de tempo de aquisição.

2.3.6 Espectroscopia de *Raman*

A espectroscopia de *Raman* é uma técnica que permite caracterizar a composição química permitindo a identificação das ligações químicas presentes num material. Não necessita de uma preparação prévia para a sua análise. Permite obter uma elevada resolução espacial (≥ 1 nm) e resolução espectral ($\geq 1\text{cm}^{-1}$). Esta técnica incide radiação que é dispersa, transmitida ou absorvida por um material. A radiação incidente na amostra interage elasticamente e inelasticamente. As interações elásticas não são importantes neste processo, por outro lado as interações inelásticas são designadas por dispersão de *Rayleigh* ou efeito de *Raman* e são estas que permitem obter informações sobre a composição química do material. Esta técnica permite utilizar a radiação suficiente para uma molécula transitar do seu estado de energia mais baixo para um nível vibracional superior. Quando o estado vibracional final é superior ao estado vibracional inicial ocorre uma dispersão de *Stokes*, o contrário designa-se por dispersão *anti-stokes* como se representa na **Figura 2.11**. A diferença energética entre a radiação incidente e a dispersa corresponde à energia de vibração dos átomos permite obter informações sobre ligações atómicas e geometria molecular. O equipamento consiste num espectrómetro de *Raman* integrado a um microscópio ótico que permite obter espectros da composição química das amostras. Neste caso, como se encontra associado um microscópio ótico designa-se por Microscopia de *Raman* que permite estudar áreas até 1 μm de diâmetro. No entanto esta técnica apresenta algumas desvantagens: a fluorescência devido a impurezas ou devido à sobreposição do sinal de *Raman*, a necessidade de instrumentação sensível devido ao fraco sinal do *efeito de Raman*, não pode ser aplicado em metais e ligas metálicas, pode causar danificação das amostras quando são expostas a radiação durante demasiado tempo ou quando são expostas a uma potencia excessiva pode provocar danos [68].

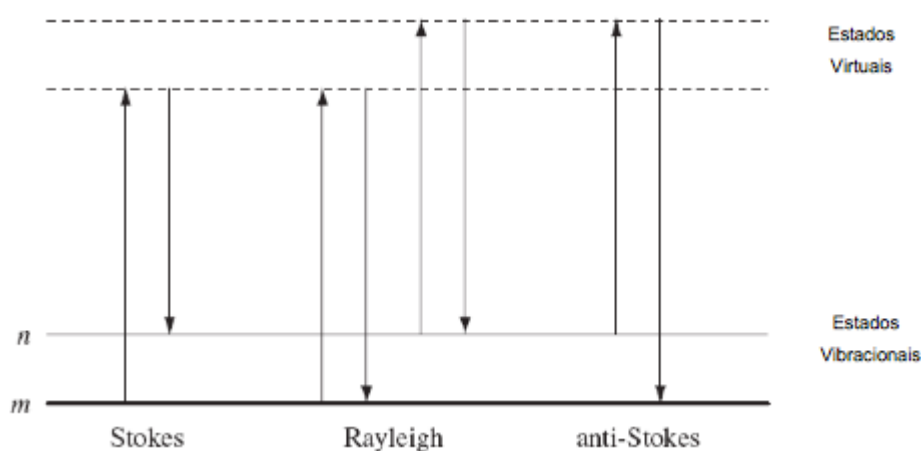


Figura 2.11: Representação dos processos de dispersão *Rayleigh* e *Raman* [68]

2.3.7 Microscopia de Fluorescência

Trata-se de uma técnica que permite observar substâncias (fluoróforos) que são excitados com radiação de baixo comprimento de onda e emitem radiação de maior comprimento de onda. Para observar as estruturas celulares ligam-se a estas estruturas fluoróforos que são excitados absorvendo luz ultravioleta e, ao desexcitarem emitem luz visível [69]. Antes de proceder à marcação, as células são fixas.

A superfície das amostras da liga AZ31 com os revestimentos foi observada por microscopia de fluorescência de modo a identificar se ocorre fluorescência dos materiais para os comprimentos de onda utilizados na observação das células. Foi utilizado o microscópio óptico *Nikon* equipado com epifluorescência do grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL. O tratamento das imagens de fluorescência das células (marcação de núcleos e da actina do citoesqueleto) foi efetuado recorrendo ao *software ImageJ*.

2.4 Estudos *in vitro*

2.4.1 Preparação das amostras para as culturas celulares

Para efetuar a cultura de células sobre uma área revestida da superfície das amostras de AZ31, delimitou-se a zona da cultura através da colagem de um tubo de polipropileno (PP). Antes de realizar as culturas celulares sobre as superfícies revestidas, foi necessário escolher uma cola que vedasse a zona de cultura e não apresentasse efeitos tóxicos para as células. Para tal, foram realizados testes que consistiram na realização de cultura de células semeadas sobre lamelas de vidro coladas a tubos de PP e semeadas sobre lamelas de vidro montadas em poços de Teflon. Realizou-se uma comparação direta entre os resultados obtidos para as duas abordagens que permitiu identificar se a cola utilizada apresentava efeitos tóxicos. Foi ainda colocada cola em contacto direto com células para avaliar o seu efeito.

Como a cola *UHU Poly Max* não se revelou tóxica, foram com ela colados tubos de PP nas amostras da liga AZ31 nas condições de revestimento estudadas: sem revestimento (liga AZ31) e com os três tipos de revestimentos sem tratamento térmico (Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO) e com tratamento térmico (Fosfatos-t, Fosfatos-HAp-t e Fosfatos-HAp/GO-t). Da mesma forma foram colados tubos de PP a lamelas de vidro para aí serem estabelecidos controlos de células. Foram também estabelecidos controlos de células em lamelas de vidro para controle adicional de possíveis efeitos tóxicos da cola. Para cada condição de cultura foram utilizadas 5 réplicas. Os materiais foram esterilizados numa solução aquosa de etanol a 70% e colocados em caixas de cultura celular com 6 poços.

2.4.2 Cultura celular

Para a cultura de células foi utilizada a linha celular *Saos-2*, derivada de um osteossarcoma humano e proveniente de *American Type Culture Collection (ATCC)*. A sua utilização possui vantagens tais como a sua disponibilidade, uma caracterização bem definida, a possibilidade de obter grandes quantidades em curtos períodos de tempo e o facto de exibirem uma sequência inteira de diferenciação de células osteoblásticas. No entanto, possuem a desvantagem de não serem verdadeiros osteoblastos já que a sua origem está associada a tecidos com patologia (tumores) [70, 71]. Para os testes *in vitro*, as células foram cultivadas em meio *McCoy* contendo 15% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, a uma temperatura de 36,5 °C e numa atmosfera humidificadora com 5% de CO₂ (ver Apêndice A). Foram realizadas duas culturas que diferiam na densidade de células semeadas e na extensão do tempo em que foram seguidas. Na primeira semearam-se 15 000 células/cm² e na segunda semearam-se 25 000 células/cm². A viabilidade celular foi avaliada às 24h, 72h, 120h, 168h e 216h na primeira cultura, na segunda cultura a viabilidade celular foi avaliada às 24h, 48h e 72h.

2.4.2.1 Viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada usando rezazurina - um corante azul não fluorescente que é utilizado como indicador de pH e como indicador de viabilidade celular. A rezazurina é reduzida a resorufina (composto cor de rosa) pelas células metabolicamente ativas. Deste modo é possível correlacionar a viabilidade celular com a alteração da cor do meio avaliada pela medição das absorvâncias para dois comprimentos de onda a 570 nm (máximo de absorvância da resorufina) e 600 (máximo de absorvância da rezazurina). A viabilidade celular é geralmente referida à de um controle de células através da razão entre as diferenças das absorvâncias medidas para estes comprimentos de onda nas duas situações. A determinação da viabilidade celular (ver Apêndice B) feita nas primeiras horas da cultura permite avaliar a taxa de adesão das células semeadas. Estudos de proliferação requerem a determinação da viabilidade celular para tempos mais longos. Deste modo, decorridas 24 horas após as sementeiras, foi determinada a viabilidade celular para o estudo da adesão celular.

2.4.2.2 Proliferação celular

A primeira cultura foi mantida durante 9 dias mudando o meio de 2 em 2 dias. As leituras da absorvância para avaliação da proliferação celular foram realizadas 3, 5, 7 e 9 dias após a sementeira. A segunda cultura foi mantida durante 3 dias. Para além da leitura das absorvâncias feita às 24h (adesão) foram feitas leituras às 48h e 72h. O meio foi mudado de 24 horas em 24 horas, após a realização dos testes de viabilidade.

2.4.3 Fixação e marcação de células

As células semeadas nos materiais foram observadas por microscopia ótica de fluorescência e por SEM.

Para a observação em microscopia de fluorescência as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA), permeabilizadas com *Triton-X* 100 e marcadas primeiro com Faloidina (*Actin-stainTM 555 Fluorescent Phalloidin*) e depois com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) (ver Apêndice C). Estas marcações permitem a observação dos filamentos de actina do citoesqueleto e dos núcleos celulares respetivamente.

A fixação de células para observação em SEM foi obtida com uma solução fixadora por 2,5% de glutaraldeído (GTA) para posterior observação em FEG-SEM (ver Apêndice D).

Capítulo 3

Discussão dos Resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da preparação e caracterização dos revestimentos e da sua degradação em soluções fisiológicas bem como a sua resposta biológica *in vitro*. Após a deposição dos revestimentos pelo método de eletrodeposição/eletroforese foram avaliadas as características físicas e químicas dos revestimentos com e sem tratamento térmico. Foram avaliadas características como: a molhabilidade, topografia, microestrutura, estrutura cristalina e composição química dos revestimentos. Foram ainda realizados testes de degradação em soluções simuladoras de fluido corporal em condições fisiológicas. Por fim, foram realizados estudos *in vitro* com células osteoblásticas da linha celular *Saos-2* para avaliação da adesão e proliferação das células osteoblásticas aos revestimentos obtidos.

3.1 Multifuncionalização (com HAp e GO) e Tratamento Térmico do revestimento aplicado na liga de Mg AZ31

As curvas potenciostáticas para os diferentes revestimentos de Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO foram obtidas pelo processo de eletrodeposição/eletroforese. As amostras foram mantidas em OCP para a estabilização do sistema. O ensaio da deposição eletroquímica foi realizado durante 2 horas através da aplicação de um potencial constante de 1 V a temperatura ambiente. As curvas potenciostáticas encontram-se na **Figura 3.1**.

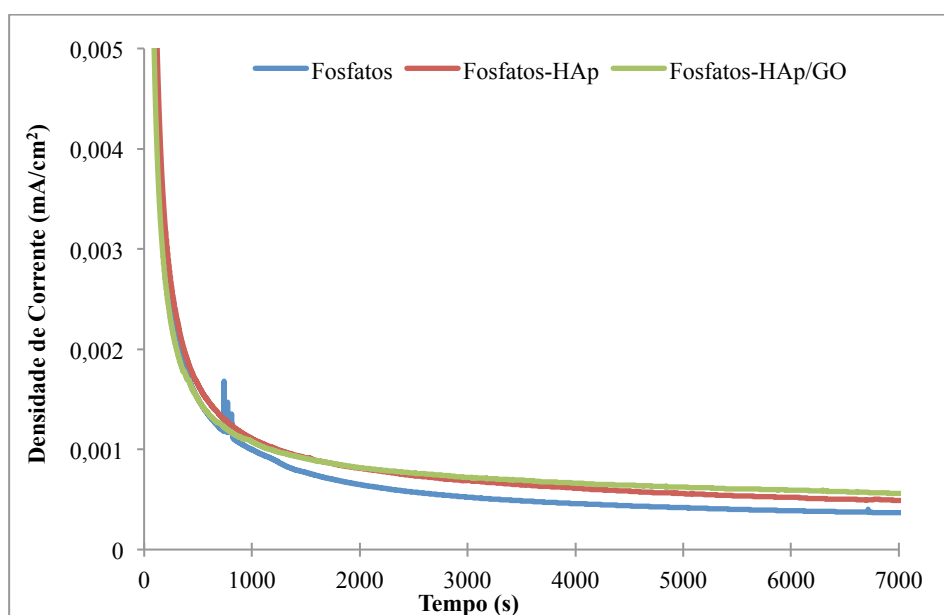
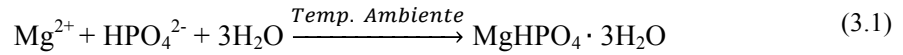


Figura 3.1: Curvas potenciostáticas para os diferentes revestimentos

Analisando as curvas potenciostáticas da **Figura 3.1** verifica-se que o revestimento de Fosfatos apresenta uma densidade de corrente mais baixa em relação aos revestimentos de Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO. Observando as curvas representadas na **Figura 3.1**, verifica-se que o revestimento de íons de fosfatos (PO_4^{3-}), aparentemente permite uma mais rápida cobertura da superfície da liga AZ31 do que na presença das nanopartículas de HAp e do GO devido à maior mobilidade dos íons (PO_4^{3-}) comparativamente com as HAp e com o GO. Os revestimentos de Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO apresentam uma densidade de corrente mais elevada e constante ao longo do tempo, no entanto, não se verificam diferenças significativas entre a densidade de corrente para estes dois revestimentos. É possível ainda verificar que as correntes se encontram na ordem de grandeza dos nanoamperes.

Estas baixas correntes podem ser atribuídas a um efeito de proteção dos revestimentos na superfície da liga AZ31. De acordo com *N.V. Kitikova* [72] e *H. Zhao* [73] e seus colaboradores, neste substrato e na presença de uma solução de fosfatos, forma-se na superfície uma estrutura hidratada de fosfatos de magnésio designada por *newberyite* ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a temperatura ambiente que se encontra representada pela reação (3.1):



A estrutura formada $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente, por eletrodeposição encontra-se representada na **Figura 3.2**.

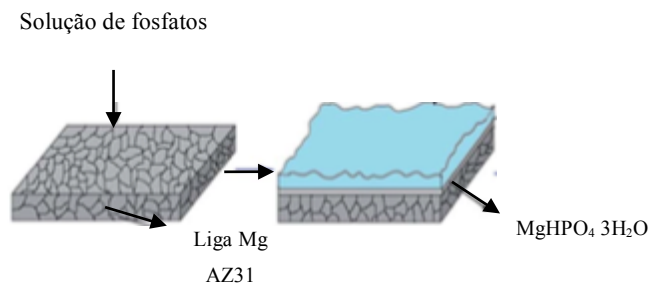
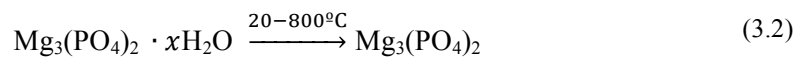


Figura 3.2: Representação da formação do revestimento de Fosfatos sobre a liga AZ31 por electrodeposição à temperatura ambiente (adaptado de: [12])

No caso do tratamento térmico, trata-se de um processo mais complexo. Para temperaturas de 20-800°C ocorre a formação de uma estrutura de fosfatos de magnésio representada pela seguinte reação:



N.V. Kitikova, demonstrou no seu estudo, que a temperaturas de 300 °C, ocorre a formação de uma estrutura de fosfatos de magnésio através de um processo de desidratação onde ocorre a remoção de moléculas de água. De acordo com a reação (3.2), podem ser combinados vários elementos químicos com os fosfatos, nomeadamente o Mg proveniente do substrato. Após a formação dos revestimentos, estes foram sujeitos a uma análise físico – química detalhada de modo a caracterizar a morfologia, composição química, cristalinidade e rugosidade da superfície. É importante conhecer as propriedades físico-químicas dos revestimentos, pois estas poderão condicionar fortemente a resposta biológica.

Para uma melhor compreensão das propriedades dos revestimentos obtidos começou-se por determinar as propriedades da microestrutura da superfície.

3.2 Caracterização físico-química dos revestimentos multifuncionais

3.2.1 Microestrutura e topografia da superfície

Para caracterizar a microestrutura da superfície foram obtidas imagens de SEM dos revestimentos de Fosfatos, Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO (**Figuras 3.3 – 3.5**).

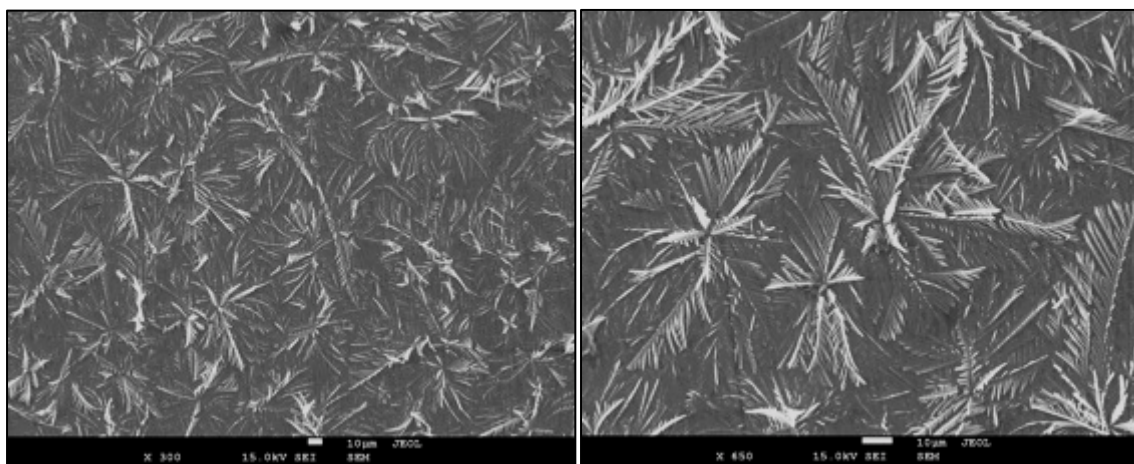


Figura 3.3: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos

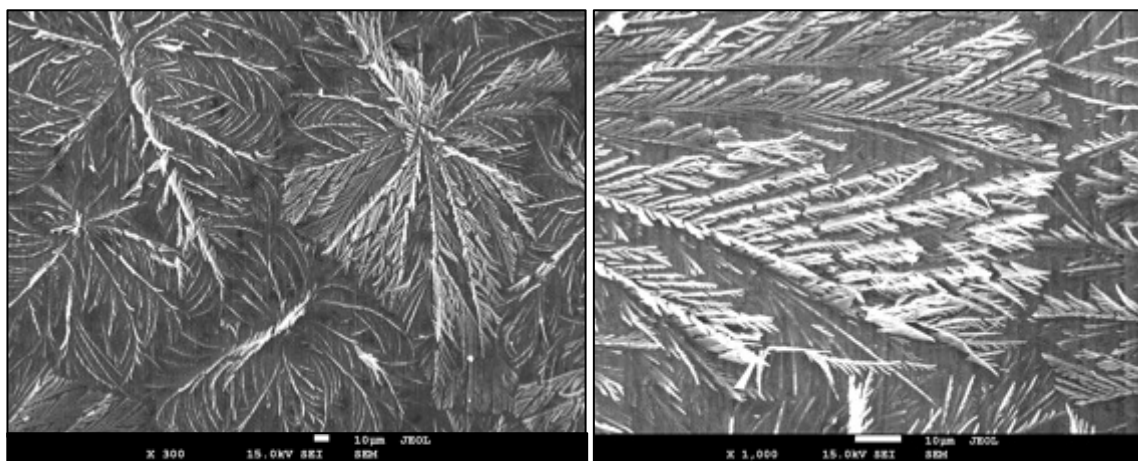


Figura 3.4: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos-HAp

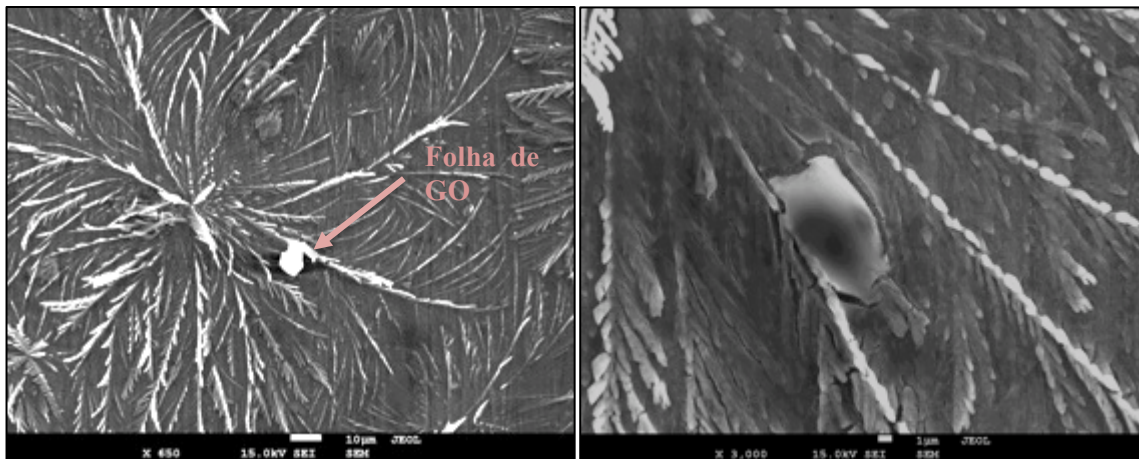


Figura 3.5: Imagens de SEM do revestimento de Fosfatos-HAp/GO

Pelas imagens de SEM da **Figura 3.3** do revestimento de Fosfatos observa-se que a superfície se encontra coberta por ramificações características dos fosfatos. Estudos realizados por *C. Santos* e colaboradores [46] já tinham verificado a formação de estruturas semelhantes, em amostras de Mg. Estas ramificações têm dimensões na ordem de grandeza dos 30 – 40 μm em comprimento, assemelham-se a estruturas finas em forma de “arbustos” crescentes em várias direções. A existência destas estruturas presente na superfície do revestimento poderá ser importante para a resposta celular dos osteoblastos visto que, os fosfatos são parte constituinte do osso humano e para além disso é descrito na literatura que os osteoblastos têm uma melhor resposta biológica em superfícies microrugosas. Através da **Figura 3.4**, observa-se que a superfície do revestimento de Fosfatos-HAp também se encontra totalmente coberta por ramificações de fosfatos, em que alguns ramos aparentam ter comprimentos superiores aos do revestimento de Fosfatos, apresentando comprimentos entre 50 – 60 μm . Por outro lado, não foi possível detetar as nanopartículas de HAp no revestimento, no entanto, a sua morfologia observada é bastante semelhante à superfície do revestimento de Fosfatos (**Figura 3.3**). Foi ainda analisada a superfície do revestimento de Fosfatos-HAp/GO em que se observa pelas imagens de SEM a incorporação de folhas submicrométricas de GO apresentando um comprimento de 10 – 20 μm (**Figura 3.5**). A morfologia dos fosfatos presentes na superfície deste revestimento é muito semelhante à de Fosfatos-HAp. As imagens dos mapas de EDX associados às imagens de SEM permitem identificar a composição química presente nos vários revestimentos. Deste modo, foram adquiridos imagens dos mapas de EDX do revestimento Fosfatos-HA/GO que se encontram na **Figura 3.6**.

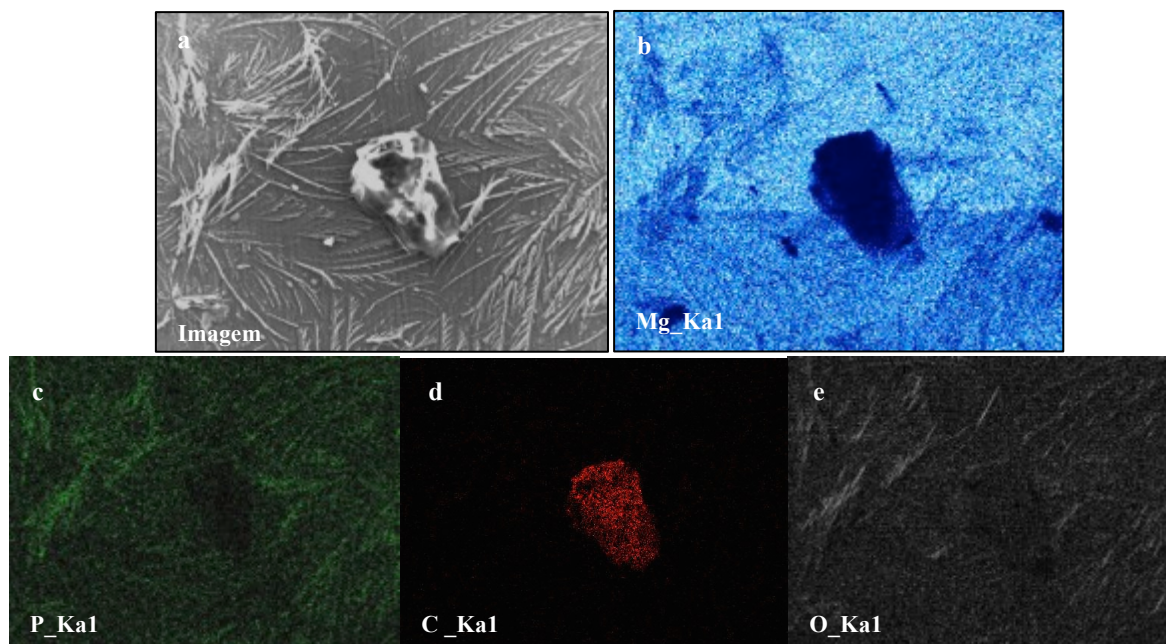


Figura 3.6: Imagens de mapas de EDX correspondentes ao revestimento Fosfatos HAp/GO: **a)** Imagem de SEM, **b)** sinal correspondente ao Mg, **c)** sinal de fosfato, **d)** sinal de carbono **e)** sinal de oxigénio

Verifica-se pela análise dos mapas de EDX a existência de Mg na **Figura 3.6b** proveniente do substrato (liga de Mg AZ31). Verifica-se também a presença dos fosfatos (P) (**Figura 3.6c**) que se encontra em toda a superfície. O sinal correspondente ao carbono (C) e oxigénio (O) encontra-se representado nas **Figuras 3.6d** e **Figuras 3.6e** respetivamente. O oxigénio faz parte da composição química dos fosfatos e das nanopartículas de HAp que apresentam uma constituição semelhante. No entanto, não é possível detetar nesta análise a presença de cálcio (Ca) proveniente das nanopartículas de HAp, porque a sua quantidade não é suficiente para ser detetada por EDX. A presença de uma maior intensidade do sinal de C em zonas mais concentradas comprova a existência de folhas micrométricas de GO, visto que o GO é constituído essencialmente por carbono como se observa a vermelho na **Figura 3.6d**.

A topografia da superfície do implante é uma propriedade importante que influencia o comportamento celular. Deste modo, foram obtidas imagens da topografia da superfície dos revestimentos: Fosfatos-HAp/GO bem como dos revestimentos sujeitos a tratamento térmico (Fosfatos-HAp/GO-t) que se encontram-se nas **Figuras 3.7**.

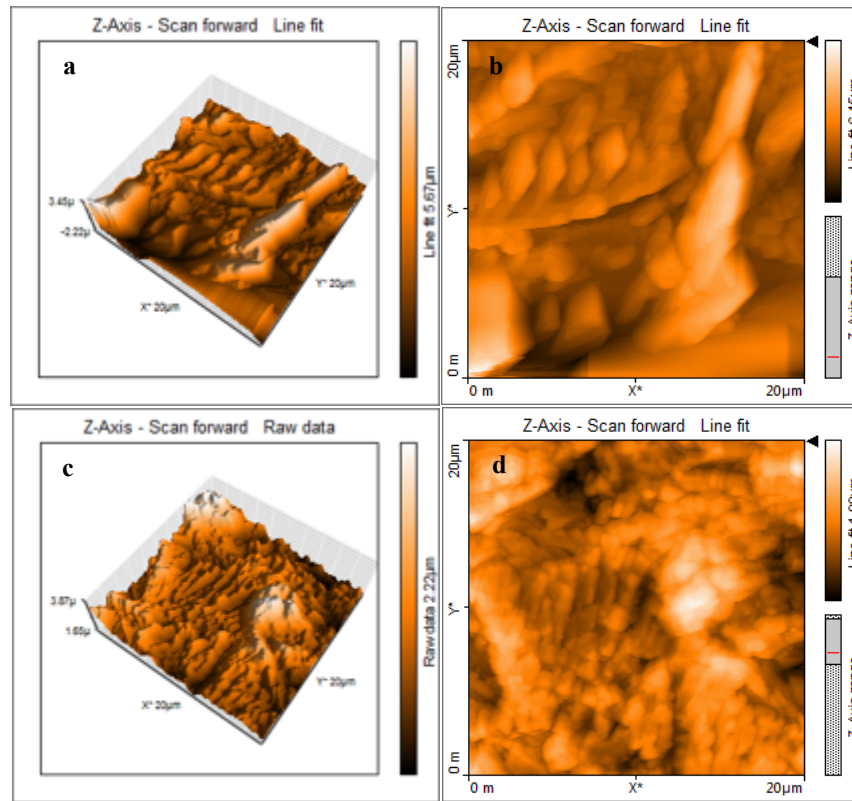


Figura 3.7: Imagens de AFM: **a)** topografia do revestimento Fosfatós-HAp/GO **b)** imagem ampliada 3D do revestimento Fosfatós-HAp/GO **c)** topografia do revestimento Fosfatós-HAp/GO-t (300 °C, 10 min) **d)** imagem 3D ampliada do revestimento Fosfatós-HAp/GO-t

Pela análise da **Figura 3.7** verifica-se que a topografia do revestimento tratado (**Figura 3.7c**) apresenta mais irregularidades na superfície em relação à topografia do revestimento não tratado representado na **Figura 3.7a**. É de notar que através das imagens de AFM de ambos os revestimentos que a superfície apresenta rugosidade, verificando-se que o revestimento tratado aparenta ter mais rugosidade do que o revestimento não tratado. Esta é uma propriedade importante em estudos biológicos, visto que já foi reportado na literatura que uma estrutura rugosa atribui melhores respostas celulares quando comparado com estruturas mais planas [74]. É possível ainda observar através das **Figuras 3.7b** e **3.7d** as ramificações dos fosfatós na superfície como já tinha sido observado nas imagens de SEM. Verifica-se ainda, que os revestimentos têm uma espessura média de aproximadamente de cerca de 1 μm. Com o tratamento térmico observa-se que não se verifica alterações significativas na morfologia da superfície como será ainda demonstrado posteriormente.

Como não foi possível detetar as nanopartículas de HAp no revestimento através das técnicas de SEM e AFM foi realizada uma análise de TEM, para confirmar a sua incorporação no revestimento (**Figura 3.8**).

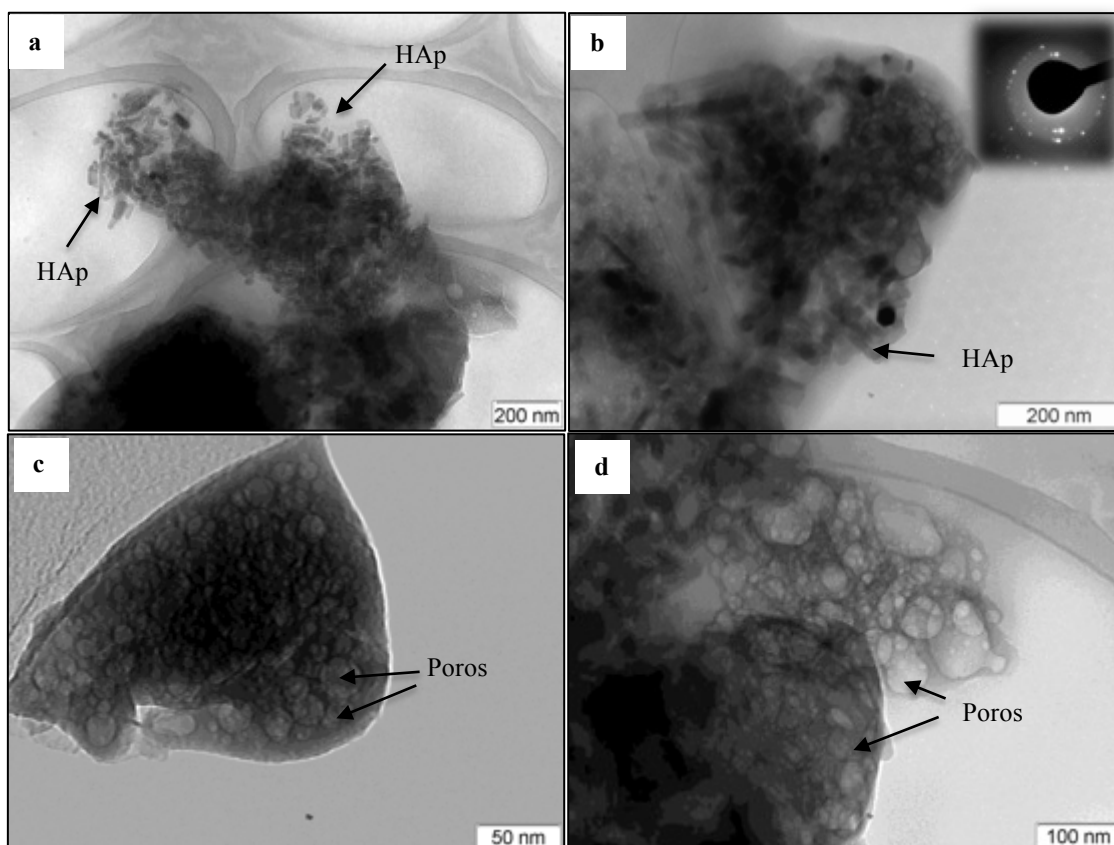


Figura 3.8: Imagens de TEM do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t: **a)** e **b)** Presença de partículas de HAp de tamanho nanométrico no revestimento, **c)** e **d)** porosidade e estrutura cristalina da HAp.

Como se pode observar pelas imagens de TEM da **Figura 3.8a e 3.8b** é notável a presença de aglomerados de partículas de HAp de tamanho nanométrico no revestimento Fosfatos-HAp/GO-t. Adicionalmente, as imagens de TEM revelam que o revestimento apresenta porosidade como se observa na **Figura 3.8c e 3.8d**. O tamanho dos poros é bastante heterogêneo, havendo poros muito grandes com diâmetro médio na ordem de 90 nm e poros pequenos com um diâmetro inferior a 10 nm. A presença dos poros no revestimento é importante pois permite promover a osteointegração [55]. A porosidade em materiais para implantes ósseos tem sido recentemente estudada por diversos autores que indicam que um material poroso facilita o transporte de fluídos e beneficia a difusão de células para o interior do implante promovendo uma maior proliferação do tecido ósseo [55]. No entanto, é importante que haja um equilíbrio entre a porosidade e a resistência mecânica do material, pois um revestimento altamente poroso pode comprometer a integridade mecânica do implante [55].

Um outro aspeto muito importante é a cristalinidade do revestimento. Da análise difração de eletrões presente na parte superior da **Figura 3.8b** é possível observar que a estrutura das nanopartículas de HAp é cristalina, devido à presença de pontos luminosos na figura.

No entanto, é necessário caracterizar esta estrutura cristalina em maior detalhe e por isso foi realizada uma análise de DRX.

3.2.2 Estrutura cristalina

Para verificar se o tratamento térmico induz algum tipo de alteração na estrutura do revestimento como se observou pela difração de elétrões que demonstrou que as nanopartículas eram cristalinas (**Figura 3.8b**) foram obtidos espectros de difração de Raios-X dos revestimentos Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t (300 °C, 10 min). Inicialmente, procedeu-se à aquisição dos espectros dos dois revestimentos no modo de configuração normal, no entanto, estes resultados não demonstraram quaisquer diferenças entre os espectros (resultados não apresentados). Isto deve-se ao facto do revestimento ter uma espessura fina e o resultado da análise de DRX apenas produz sinal do substrato (liga AZ31). Devido a isto, foi realizada a aquisição dos espectros no modo de configuração rasante (2 graus) para caracterizar o revestimento (**Figura 3.9**).

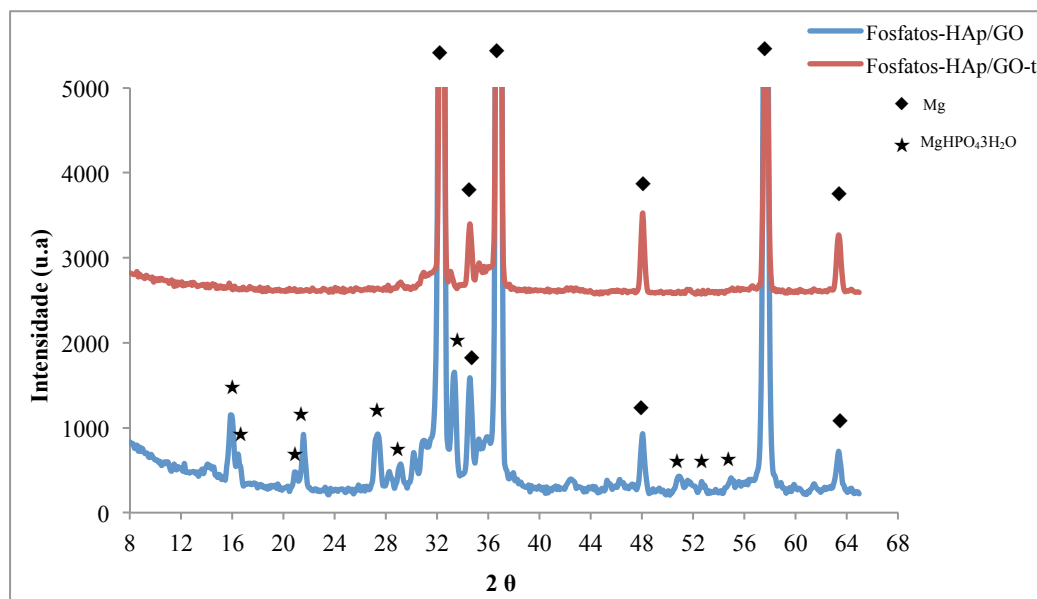


Figura 3.9: Espectro de DRX dos revestimentos Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t

O espectro obtido por DRX representado na **Figura 3.9** mostra que o revestimento Fosfatos-HAp/GO sem tratamento térmico apresenta para valores de 2 theta baixos (15-32) picos bem definidos característicos de uma estrutura cristalina, denominada *newberyite* (JCPDS 35-780). Comparativamente ao revestimento sujeito a tratamento térmico Fosfatos-HAp/GO-t verifica-se que os picos característicos da estrutura *newberyite* não são detectados. A ausência desses picos mostra que a estrutura do revestimento torna-se amorfa. O que está de acordo com o descrito por *M. Sadiq* [75].

Segundo este autor tratamentos térmicos de fosfatos de magnésio a temperaturas inferiores a aproximadamente 700 °C dão origem a estruturas amorfas devido a desidratação do fosfato de magnésio (reação 3.2). Ou seja, a temperatura de 300 °C não torna a estrutura cristalina, mas sim amorfa. Só para temperaturas de 700° C ocorre a cristalização dos fosfatos (fosfatos de Mg) segundo *M. Sadiq* [75]. Em ambas as amostras são detectados picos correspondentes ao Mg. As intensidades dos picos foram obtidas de acordo com JCPDS 21-1152. Após a deposição eletroquímica o revestimento apresenta na sua constituição nanopartículas cristalinas de HAp em conjunto com uma estrutura de fosfatos de Mg hidratado que é cristalino. Por outro lado, após o tratamento térmico, as HAp continuam cristalinas como já se tinha observado por TEM (**Figura 3.8b**) combinada com uma estrutura de fosfatos de Mg amorfo detetada no DRX. Relativamente ao GO o pico de difração localiza-se teoricamente a um 2θ de 10° , no entanto para ser visível picos de intensidades no espectro de difração de raios-X é necessário ter quantidades superiores a 1% do peso molecular do material o que não se verifica para este revestimento visto que a quantidade de GO na solução do depósito é baixa. O mesmo ocorre para as nanopartículas de HAp. Embora o GO tenha sido identificado pelos mapas de EDX do SEM através do sinal de carbono, é importante analisar a sua presença de forma mais precisa, visto que este material apresenta propriedades que induzem uma boa resposta biológica.

3.2.3 Composição química

Foram obtidos espectros de microscopia de *Raman* para o revestimento Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t (300°C 10 min) de modo a identificar a composição química de ambos os revestimentos. Os espectros obtidos encontram-se na **Figura 3.10**.

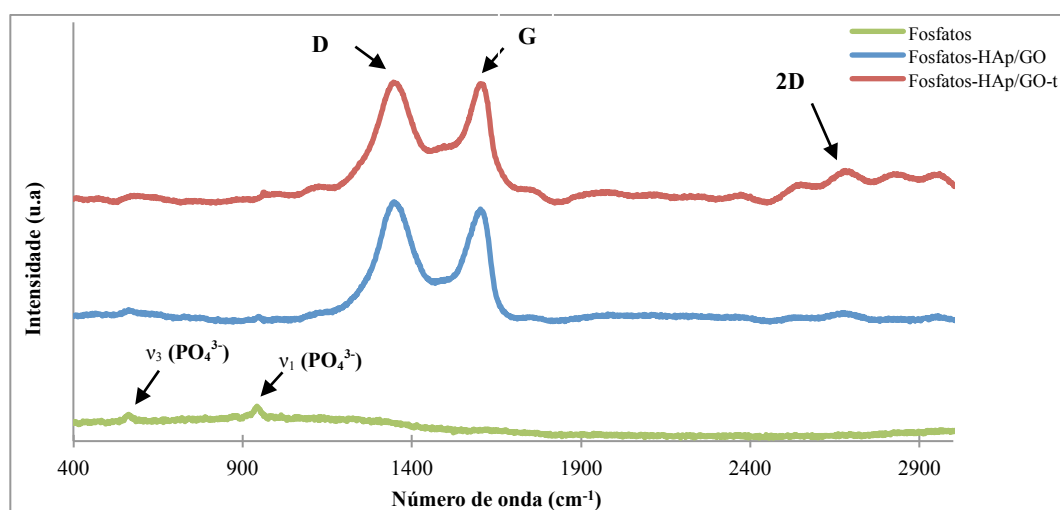


Figura 3.10: Espectro de *Raman* para: Fosfatos, Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t

Através da **Figura 3.10** como se pode verificar observa-se picos pouco intensos para o revestimento de Fosfatos. Os picos característicos dos fosfatos localizam-se aproximadamente a 570 e 960 cm^{-1} e são atribuídos a modos de vibração ν_3 e ν_1 respectivamente. Estes resultados encontram-se de acordo com a literatura [36]. Por outro lado, os fosfatos tratados termicamente não foram apresentados devido à sua estrutura amorfa como se verificou pelo DRX. Relativamente ao GO são bem visíveis as bandas D e G localizadas a 1340 e 1560 cm^{-1} respetivamente. Estas bandas são características do GO e permitem confirmar novamente a existência deste composto no revestimento, o qual já tinha sido observado através dos mapas de EDX. O pico da banda D indica a presença de alguns defeitos cristalinos enquanto que o pico da banda G é originado devido a planos de vibração sp^2 dos átomos de carbono [36]. É ainda bem visível a banda 2D localizada a 2660 cm^{-1} característica de multicamadas de GO. Através da análise da **Figura 3.10** verifica-se ainda que o tratamento térmico (300 °C, 10 min) não altera a estrutura do GO.

3.2.4 Molhabilidade

A molhabilidade da superfície é influenciada não só pelas propriedades químicas da sua constituição mas também por parâmetros topográficos como a rugosidade e a textura. Essas propriedades de superfície influenciam também a proliferação celular porque a interação entre as células e o implante envolve ligações físico-químicas através de forças iónicas ou através da alteração na adsorção de moléculas (proteínas) [76]. Por estes motivos foi realizada uma análise do ângulo de contacto para todas as amostras como se observa na **Figura 3.11**.

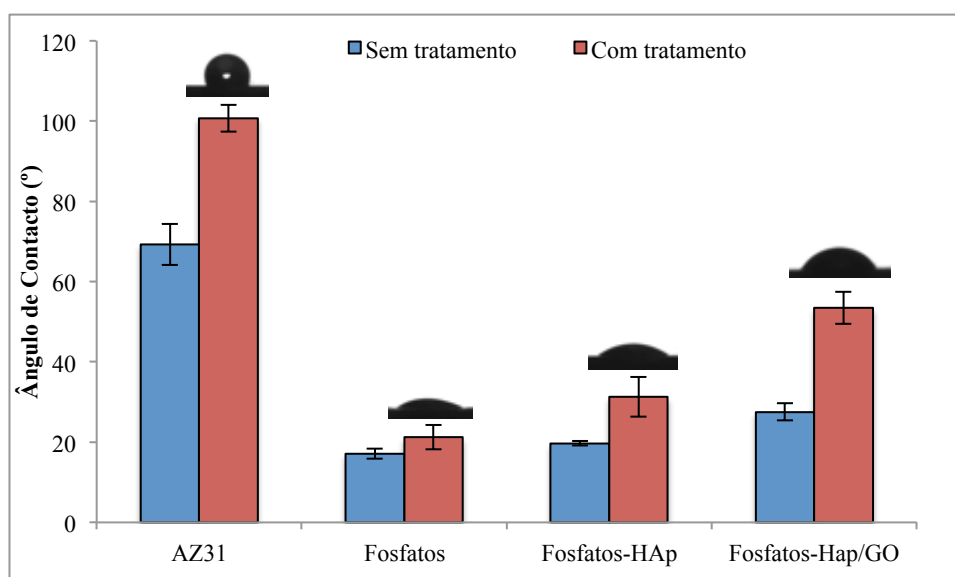


Figura 3.11: Ângulos de contacto dos revestimentos com e sem tratamento térmico

Como se pode observar pelo gráfico da **Figura 3.11**, em geral todos os revestimentos sujeitos a tratamento térmico (300 °C, 10 min) têm um ângulo de contacto superior quando comparados com os revestimentos não tratados. O tratamento térmico poderá induzir alterações na superfície, nomeadamente na remoção de moléculas de água, que poderão tornar a superfície menos hidrofílica. Como se pode verificar por comparação de resultados o substrato AZ31 sem tratamento é mais hidrofóbico do que qualquer revestimento, apresentando um ângulo de contacto próximo dos 70°. No caso do revestimento de Fosfatos e de Fosfatos-HAp, verifica-se que o ângulo de contacto é semelhante entre si, (~20°), mas muito menor do que o AZ31, ou seja a superfície é mais hidrofílica na presença dos revestimentos. No caso do revestimento Fosfatos-HAp/GO, verifica-se um ligeiro aumento do ângulo de contacto. O GO possui um comportamento hidrofílico [77], no entanto poderá se coordenar com iões ou partículas que estão dispersas no eletrólito e tornar-se mais hidrofóbico. Da análise da **Figura 3.11**, observa-se que as amostras após tratamento térmico, tornam-se menos hidrofílicas sendo essa diferença mais notória nas amostras de AZ31 e no revestimento Fosfatos-HAp/GO. Este aumento do ângulo de contacto poderá dever-se à perda de grupos induzindo um aumento do ângulo e tornando a superfície menos hidrofílica que revestimentos de Fosfatos e de Fosfatos-HAp. Em geral todos os revestimentos são considerados hidrofílicos pois apresentam ângulos de contacto inferiores a 90°.

3.3 Estudos de degradação dos revestimentos em condições fisiológicas

Para um estudo detalhado da degradação dos revestimentos em condições fisiológicas foram realizados dois estudos. Num deles as amostras revestidas e não revestidas foram mantidas numa solução simuladora de fluido corporal durante 24 horas e foi monitorizado o potencial de circuito aberto com o tempo. Num outro estudo, essa avaliação foi realizada usando curvas de polarização. Estas curvas têm sido muito usadas na literatura para caracterizar a degradação de revestimentos aplicados no magnésio [20].

As curvas de potencial de circuito aberto foram obtidas para as amostras: AZ31 (sem revestimento), Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t. Estes ensaios foram realizados em condições fisiológicas (SBF: 37,5 °C e pH 7,4) e encontram-se representados na **Figura 3.12**:

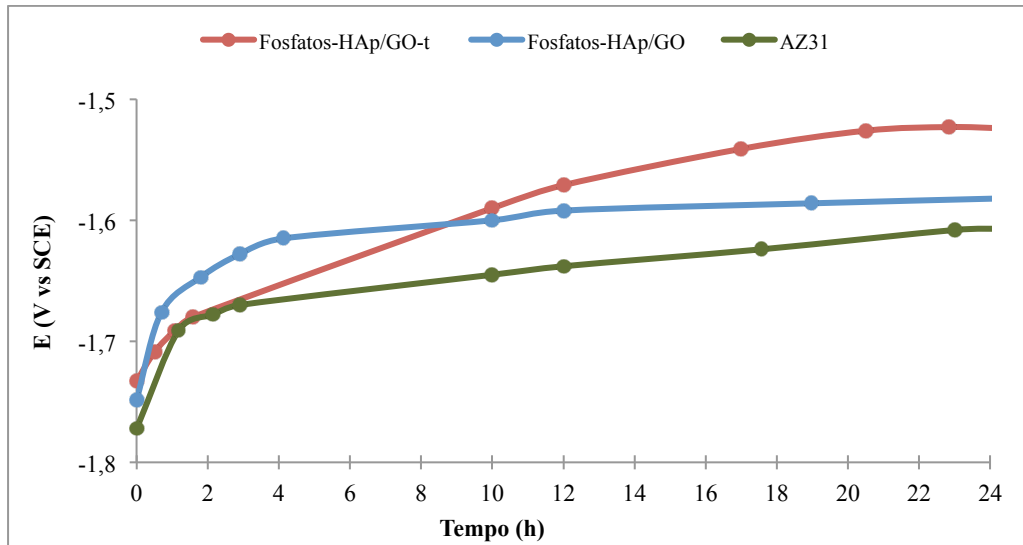


Figura 3.12: Curvas de potencial de circuito aberto para as amostras Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t

Verifica-se pela **Figura 3.12**, para todas as amostras AZ31, Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t que inicialmente o potencial desloca-se rapidamente para potenciais mais nobres, correspondendo à formação de uma camada sobre a superfície do material exposto que atua como barreira. Numa fase posterior o potencial tende para um valor estável correspondendo a um crescimento estável de fosfatos de cálcio na superfície do material que conduz à diminuição da taxa de degradação das amostras. Adicionalmente observa-se que ao final de 24 horas a amostra com HAp/GO tratada termicamente apresenta um potencial menos negativo (-1,524 V) do que nas amostras não tratadas termicamente e do que a AZ31. Verifica-se desta análise que as amostras revestidas apresentam sempre um potencial mais nobre do que o AZ31.

Tal como referido anteriormente, a avaliação da degradação dos revestimentos pode ser obtida usando soluções fisiológicas que simulam o ambiente biológico do corpo humano. Para avaliar a degradação dos diferentes revestimentos foram obtidas as curvas de polarização potenciodinâmicas dos revestimentos de Fosfatos, Fosfatos-HAp, Fosfatos-HAp/GO, Fosfatos-t, Fosfatos-HAp-t e Fosfatos-HAp/GO-t e da liga AZ31. Estes ensaios foram realizados em condições fisiológicas (37,5 °C, pH 7,4), os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 3.13**.

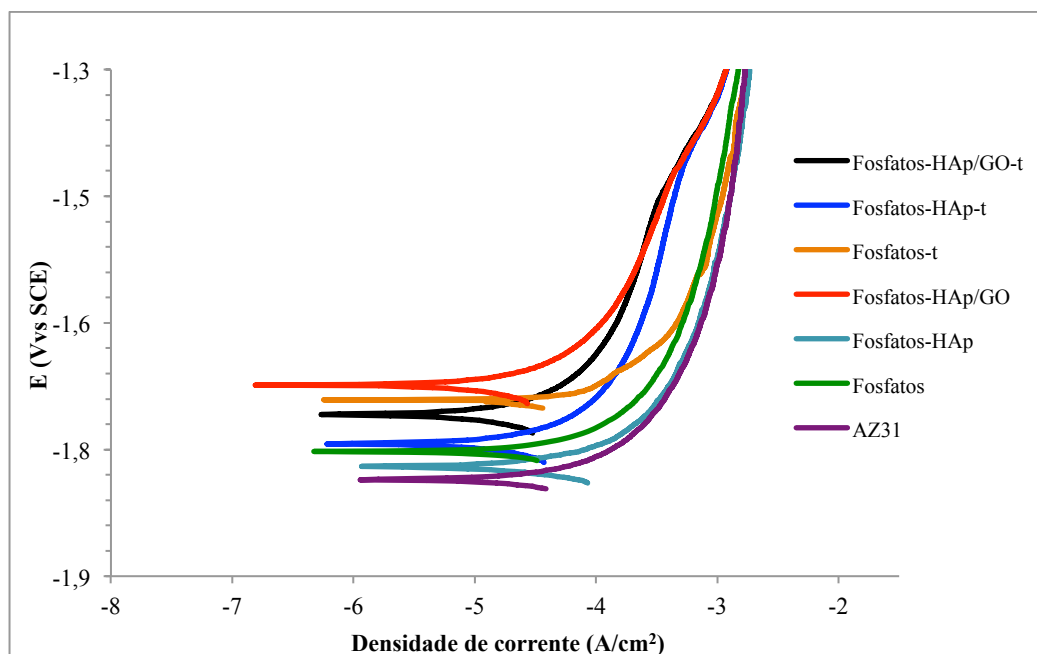


Figura 3.13: Curvas de polarização potenciodinâmicas para os diferentes revestimentos em condições fisiológicas (37,5 °C, pH 7,4)

Analisando as curvas de polarização potenciodinâmicas da **Figura 3.13** verifica-se que a liga AZ31 não revestida apresenta um potencial menos nobre do que as amostras revestidas. Dos resultados verifica-se que os revestimentos têm um efeito de proteção. Por análise dos resultados, verifica-se que os revestimentos sujeitos a tratamento térmico: Fosfatos-t, Fosfatos-HAp-t e Fosfatos-HAp/GO-t têm potenciais de degradação mais nobres do que os revestimentos sem tratamento (Fosfatos e Fosfatos-HAp) excepto no revestimento Fosfatos-HAp/GO que apresenta o potencial mais nobre (-1,67 V) e correntes mais baixas quando comparadas com as restantes amostras. Sabe-se que o potencial de degradação está diretamente relacionado com a taxa de degradação do material, ou seja, quanto mais negativo for o potencial maior será a sua tendência à degradação. Assim, o tratamento térmico aparenta ter um efeito benéfico na taxa de degradação das amostras tornando o processo de degradação mais lento devido à libertação de produtos de degradação que formam uma barreira mais protetora.

Em relação às correntes verifica-se que os revestimentos tratados Fosfatos-HAp-t e Fosfatos-HAp/GO-t e o revestimento Fosfatos-HAp/GO apresentam correntes mais baixas em relação aos restantes revestimentos o que significa que nestas condições o revestimento torna-se mais protetor o que parece indicar uma maior resistência à degradação. Estes resultados encontram-se de acordo com estudos recentes que demonstram que ligas de Mg (AZ91) e Mg ultra puro revestidas com o compósito HA/GO em ambientes fisiológicos (SBF) melhoram significativamente a resistência à degradação [46, 78].

Outros autores aplicam revestimento compósito (HA/GO) a um substrato de Ti e verificaram também uma melhor resistência à degradação [36]. Estudos revelam que uma maior resistência à degradação para além de garantir um maior tempo de vida do implante promove a adesão celular aumentando a integridade mecânica [79]. Embora estes testes de degradação sejam úteis na avaliação da degradação de uma amostra, o fluido corporal simulado utilizado (SBF) não contém proteínas essenciais presentes no corpo humano que também participam em processos de degradação. É importante referir ainda também que a aplicação do varrimento de potenciais na ordem de grandeza dos volts é muito superior ao que ocorre no corpo humano, sabe-se que os potenciais envolvidos no corpo humano são da ordem dos mV.

3.4 Interação celular com os revestimentos multifuncionais

A interação celular com o material, testada *in vitro*, é um requisito fundamental na avaliação dos revestimentos. A viabilidade celular e a observação das células semeadas sobre os revestimentos dão-nos indicações acerca da adequação destes como suportes celulares. Como a fluorescência do material pode afetar a observação microscópica das células marcadas com fluóforos, procedeu-se assim a uma observação prévia dos materiais por microscopia de fluorescência. As imagens analisadas por microscopia de fluorescência usando os filtros azul, verde e vermelho para o revestimento Fosfatos-HAp/GO encontram-se na **Figura 3.14**.

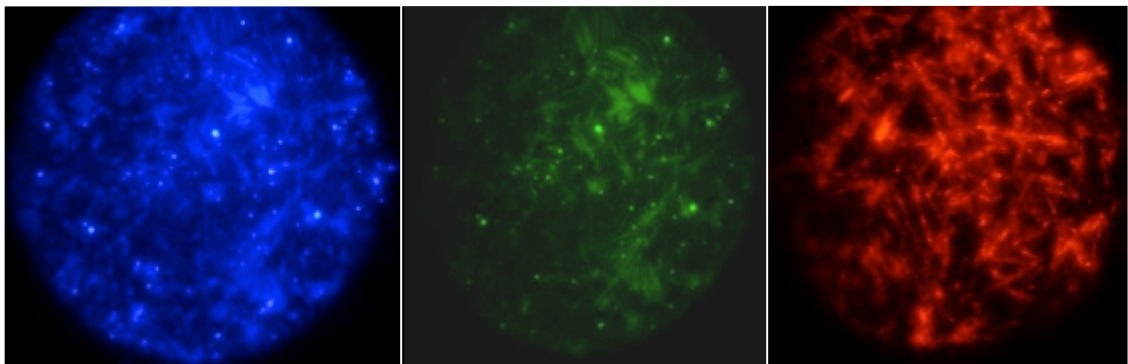


Figura 3.14: Imagens de microscopia de fluorescência do revestimento de Fosfato-HAp/GO obtidas usando os vários filtros disponíveis no microscópio

A **Figura 3.14** mostra que os constituintes dos revestimentos apresentam fluorescência que poderá comprometer a observação das células. Nestas imagens é possível observar as ramificações dos fosfatos em todas as direções.

3.4.1 Adesão e Proliferação celular

A primeira cultura de células osteoblásticas da linhagem celular *Saos-2* nos vários revestimentos foi feita semeando uma densidade de células de 20 000 células/cm². Usaram-se 5 réplicas de cada revestimento. Os resultados obtidos para a viabilidade celular após 1, 3, 5, 7 e 9 dias em cultura encontram-se na **Figura 3.15**. A respetiva incerteza foi calculada por propagação dos desvios padrão experimentais.

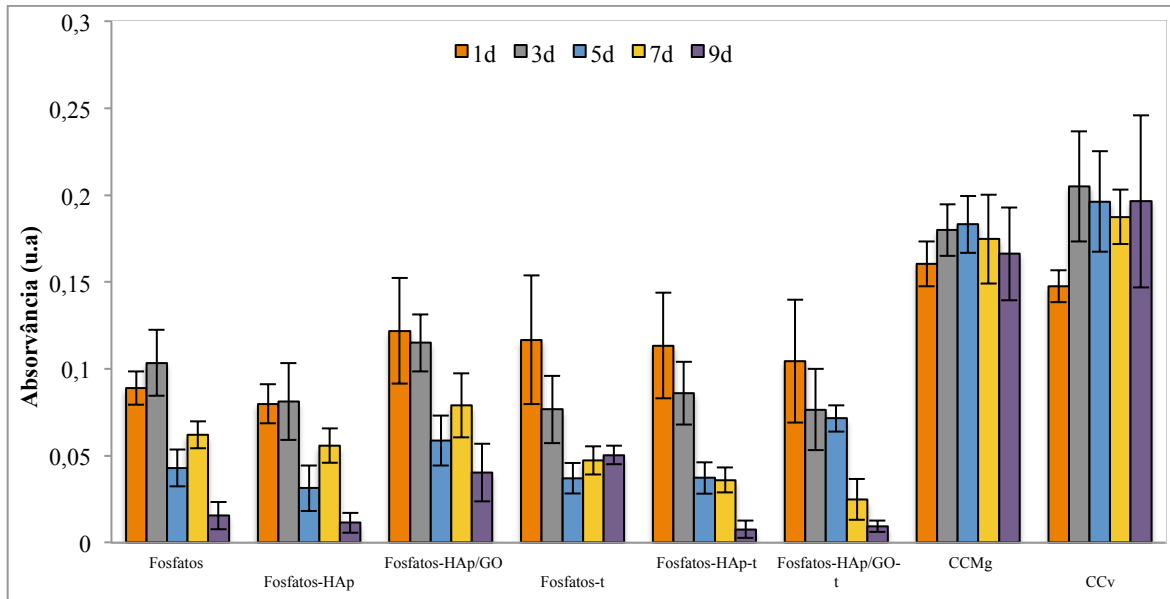


Figura 3.15: Viabilidade celular nos diversos revestimentos medida ao fim de 1, 3, 5, 7 e 9 dias

Observando a **Figura 3.15** verifica-se que a adesão celular foi em geral menor nos revestimentos do que na liga AZ31 (CCMg). Relativamente à proliferação celular os resultados parecem apontar para que em todos os revestimentos a população celular decresceu com o tempo de cultura: ao 5º dia é possível notar uma elevada diminuição da densidade de células nos revestimentos e ao 7º dia observa-se uma ligeira recuperação embora esta não seja significativa. Já na liga AZ31 (CCMg) a população de células parece não sofrer alteração ao longo do tempo em cultura. A comparação entre os resultados para as amostras Fosfatos-HAp e Fosfatos-HAp/GO parece sugerir que a adição do GO ao revestimento melhora a viabilidade celular. Erros associados aos procedimentos de sementeira (diferentes densidades de células semeadas nos vários poços) mudança de meios (aspiração de células) e de falta de precisão nas pipetagens associadas ao teste de viabilidade, poderão ter afetado estes resultados. Acresce-se o facto de, como se pode perceber pela análise da **Figura 3.15**, a densidade de células nos materiais ter sido sempre pequena o que torna mais difícil chegar a resultados conclusivos.

Apesar dos resultados da primeira cultura não evidenciarem correlações claras entre a constituição dos revestimentos e o facto de sofrerem ou não tratamento com a viabilidade celular, eles indicam que, em geral, a viabilidade celular nos materiais revestidos decresce com o tempo de cultura. Se a perda de viabilidade celular estivesse associada à rápida degradação do substrato, seria de esperar que a viabilidade no CCMg diminuísse mais rapidamente. No entanto não foi isso que se verificou, de onde se poderá especular que os revestimentos possam introduzir alguma toxicidade no meio.

A estrutura tridimensional dos cristais também poderá dificultar a adesão celular. Estudos realizados mostram, através de testes de citotoxicidade *in vitro* (testes de extratos) a ligas de Mg: Mg-1Al e Mg-1Zn, que não ocorre uma diminuição significativa da viabilidade celular em células osteoblásticas (MC3T3-E1) [22]. Por outro lado, *J. Niederlaender* e colaboradores mostram no seu estudo uma diminuição significativa da viabilidade celular de células osteoblásticas (*Saos-2*) e MSCs em contacto direto com ligas de Mg (MgAl3Zn1), após 24h. Esta diminuição deve-se ao facto de ocorrer uma libertação de elevadas quantidades de Mg induzindo efeitos citotóxicos nas células. Além do mais, estes autores referem ainda que a libertação de iões Al combinados com uma elevada concentração de iões Mg aumentam os efeitos citotóxicos [80].

Após os 9 dias de cultura as células ainda presentes nos diversos revestimentos foram fixadas e marcadas. Só foi possível observar células nos controlos de células semeadas no vidro (CCv) e na liga AZ31 (CCMg) como se mostra na **Figura 3.16**.

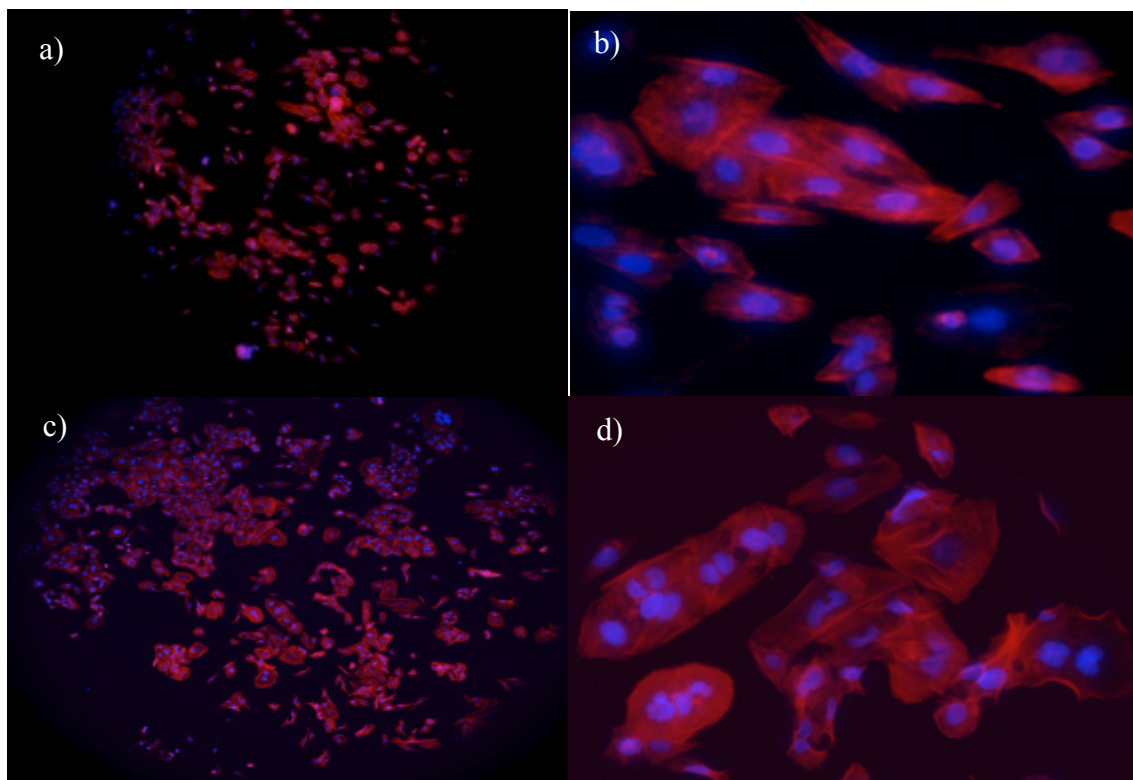


Figura 3.16: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, dos núcleos e dos citoesqueletos das células obtidas por marcação com DAPI (azul) e com Faloidina (vermelho), respetivamente: **a)** CCMg ampliação 10x **b)** CCMg ampliação 40x, **c)** CCv ampliação 10x e **d)** CCv ampliação 40x.

Após os 9 dias de cultura, não foi possível observar as células em qualquer um dos revestimentos provavelmente devido ao seu baixo número.

Como se verificou anteriormente os próprios revestimentos são fluorescentes o que dificulta as observações. Na liga AZ31 (CCMg) (**Figuras 3.16a e 3.16b**) e nos CCv (**Figuras 3.16c e 3.16d**). Observam-se núcleos (a azul) e citoesqueletos (vermelho) em maior quantidade no vidro (CCv).

Os resultados desta primeira cultura levaram ao planeamento de uma nova cultura com uma densidade de sementeira maior e com uma análise de viabilidade diária e seguindo a cultura até ao terceiro dia.

Na segunda cultura de células osteoblásticas *Saos-2* semearam-se 25 000 células/cm² e utilizaram-se 4 réplicas de cada amostra. Numa das amostras foram fixas após 24h de cultura para observação em SEM. Foram realizados controlos de células em vidro de modo a serem observados regularmente em contraste de fase no microscópio ótico e observar a sua evolução ao longo do tempo. As imagens de contraste de fase encontram-se na **Figura 3.17**.

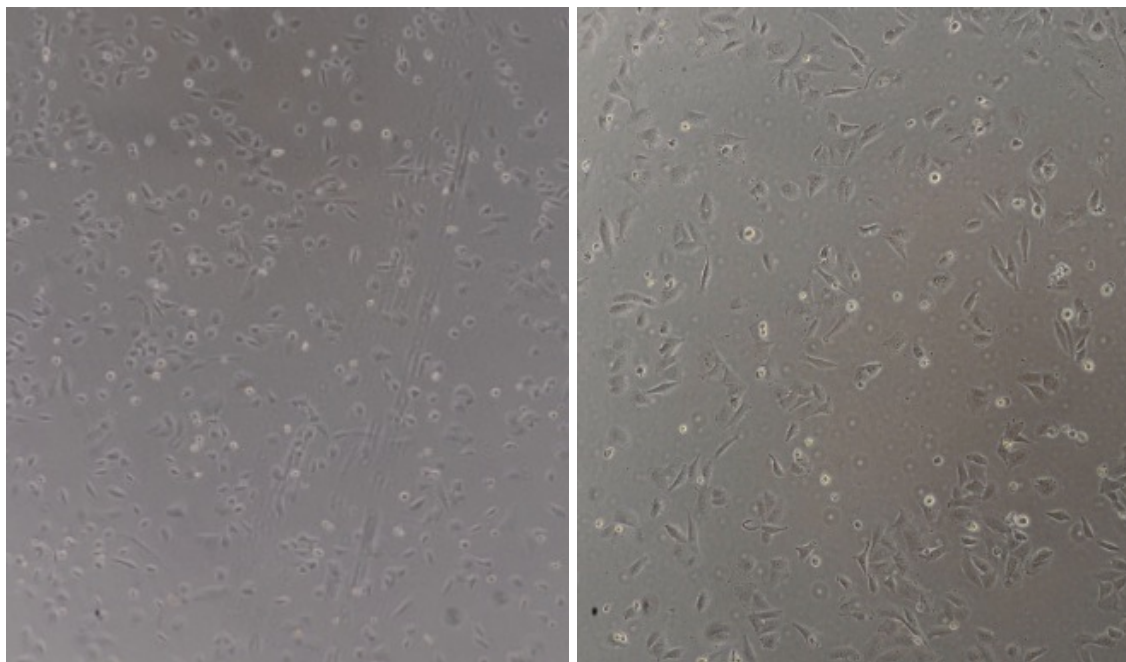


Figura 3.17: Imagens de contraste de fase de células semeadas em lamelas de vidro (CCv) (ampliação 10x)

Os resultados de viabilidade celular obtidos ao fim de 24 h – avaliação da adesão celular para as células semeadas na liga AZ31 e nos vários revestimentos encontram-se na **Figura 3.18**. A respetiva incerteza foi calculada por propagação dos desvios padrão experimentais.

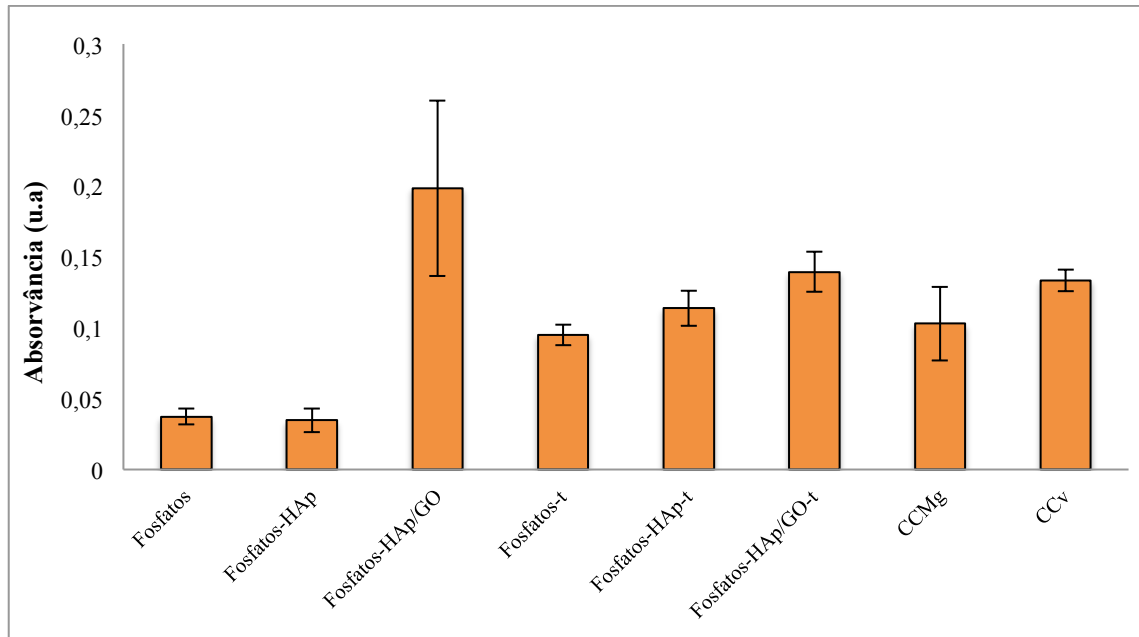


Figura 3.18: Medições de absorvância correspondente à adesão das células após as 24 h para os diversos revestimentos na segunda cultura

Os resultados da **Figura 3.18** não mostram diferenças significativas na adesão das células aos revestimentos de Fosfatos e Fosfatos-HAp. A tendência desta adesão ser menor do que a verificada na liga AZ31 (CCMg) é semelhante ao que se verificou na primeira cultura. Relativamente ao revestimento de Fosfatos-HAp/GO verificou-se que no final do teste apresentavam uma coloração indicativa da presença de mais células em comparação com o CCMg. Esta mudança de cor poderá indicar uma possível contaminação dos poços com microrganismos. Apesar de numa observação microscópica do meio destes poços não se ter detetado a presença de microrganismos não se pode garantir que eles não estivessem presentes pois por vezes são difíceis de visualizar. O meio de todos os poços foi mudado e suplementado com um antibiótico adicional – *Gentamicin* de concentração de 10mg/ml.

Relativamente ao tratamento térmico, os resultados indicam que a adesão aos revestimentos de Fosfatos-t e Fosfatos-HAp-t foi maior do que a adesão aos correspondentes revestimentos não tratados, pelo que o tratamento térmico parece ter tido alguma influência na adesão celular. A adição do GO ao revestimento também parece melhorar a adesão celular. A influencia positiva do GO na adesão de células osteoblásticas já foi reportada na literatura [56, 76]. A adesão de células é um processo bastante complexo e é afetado por diversos aspetos como as propriedades da superfície. Por exemplo, o GO tem na sua constituição grupos funcionais que conferem propriedades hidrofílicas à superfície que podem promover a adesão celular [81].

A molhabilidade pode influenciar diretamente a interação entre as células e a superfície através de forças iônicas ou indiretamente pela adsorção de moléculas (proteínas constituintes do meio celular) [76]. Os resultados da molhabilidade dos revestimentos indicam que todos os revestimentos são hidrofílicos. Comparando a molhabilidade da superfície dos revestimentos e o respectivo estudo da adesão celular pode-se concluir que os revestimentos tratados, apresentam maior densidade de células aderidas apesar de serem menos hidrofílicos que os restantes. Estes resultados encontram-se de acordo com estudos realizados que atribuem uma maior adesão celular em superfícies hidrofílicas [81].

A topografia da superfície do implante é outra propriedade importante que influencia a adesão e o comportamento celular tanto *in vitro*, como *in vivo*. Uma revisão da literatura sugere que superfícies microrugosas estimulam a adesão e diferenciação celular em comparação com superfícies lisas [81]. Estudos referidos recentes atribuem melhores respostas celulares a superfícies rugosas [74]. Os resultados referentes à topografia dos revestimentos aqui estudados indicaram que o tratamento térmico aumenta a rugosidade em relação aos revestimentos não tratados. Esta rugosidade adicional pode contribuir para a melhor adesão celular verificada. Como já foi referido anteriormente, o tratamento térmico (a 300° C), torna a estrutura dos fosfatos de magnésio amorfa. No entanto, a estrutura da HAp continua cristalina. A adesão celular observada nos revestimentos tratados (Fosfatos-t e Fosfatos-HAp-t) foi maior do que a adesão nos revestimentos não tratados (Fosfatos e Fosfatos-HAp) onde a estrutura dos fosfatos de magnésio é cristalina. Estes resultados encontram-se de acordo com os de *M. Nabyouni* e colaboradores que demonstraram *in vitro* que células pré-osteoblásticas aderem melhor a fosfatos de Mg amorfo do que a estruturas mais cristalinas [82].

As leituras de absorvância que permitem avaliar a proliferação celular nos vários revestimentos foram realizadas após 24h, 48h e 72h das células em cultura. Os resultados encontram-se na **Figura 3.19**. A respetiva incerteza foi calculada por propagação dos desvios padrão experimentais.

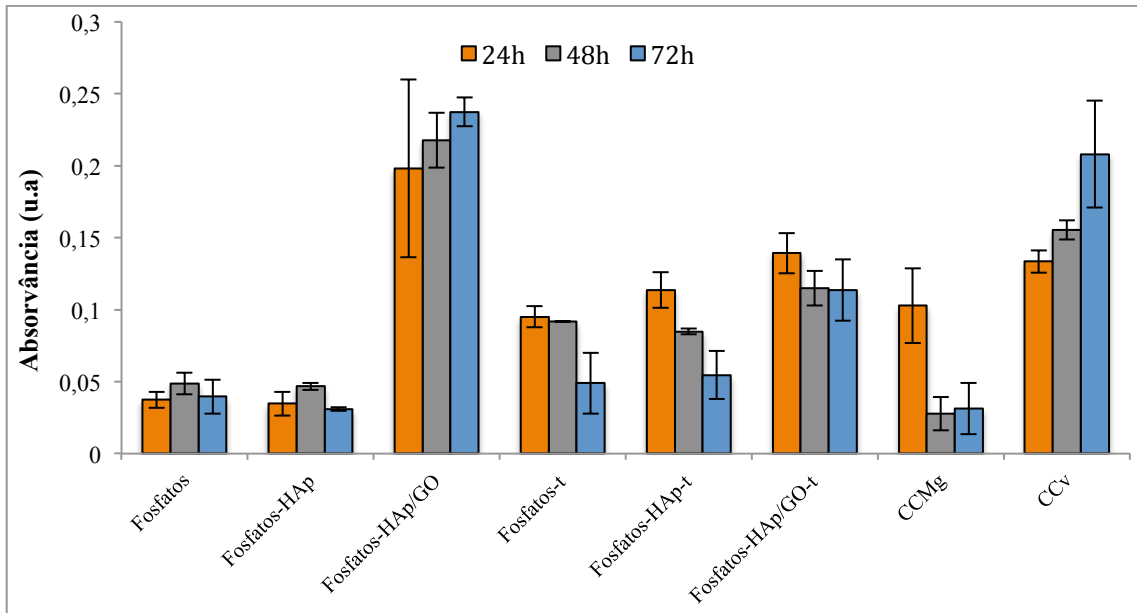


Figura 3.19: Avaliação da proliferação celular para os diversos revestimentos para 24 h, 48 h e 72 h

Através da **Figura 3.19**, verifica-se que, em termos gerais, não há crescimento da população celular ao longo do tempo de cultura e que à excepção do revestimento que incorpora GO, os revestimentos tratados têm uma viabilidade celular sempre superior aos revestimentos não tratados o que se deve à maior adesão verificada.

A presença de fosfatos de Mg amorfos nas amostras tratadas permitirá uma maior viabilidade celular em relação às estruturas cristalinas [82]. No entanto, para tempos mais longos a degradação dos revestimentos torna-se mais rápida, muito provavelmente devido à sua estrutura amorfa, o que pode conduzir à diminuição da viabilidade celular. Esta diminuição é mais significativa para o período entre as 48h e as 72h nos revestimentos tratados que não incorporam GO e para os quais se verifica uma diminuição da população de células. Com a adição do GO, não se verifica esta diminuição na população. Não se observam diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo para as viabilidades celulares nos revestimentos não tratados. Este facto pode estar associado à estrutura cristalina dos fosfatos de cálcio não tratados que será responsável por um processo de dissolução do Mg mais lento.

Os revestimentos Fosfatos-HAp/GO e Fosfatos-HAp/GO-t foram os que apresentaram melhores resultados de viabilidade celular apesar do revestimento Fosfatos-HAp ter a constituição mais semelhante à do osso. A baixa quantidade de nanopartículas de HAp existentes no depósito do revestimento (embora não tenha sido possível quantificar este valor) poderá explicar o facto.

Ao contrário do que se verificou na primeira cultura foi possível observar ainda que a viabilidade celular nos revestimentos foram superiores ao CCMg.

Este pode ser um indicio de que estes revestimentos possam induzir uma resposta celular melhorada. Verifica-se que para as 48h e 72h ocorre uma diminuição significativa da viabilidade celular no CCMg o que pode ser explicado em parte pela elevada degradação do Mg que pode provocar a morte das células. Diversos estudos demonstram que o Mg em elevadas doses pode inibir a diferenciação de osteoblastos provocando morte celular como já foi referido anteriormente [83].

As imagens de fluorescência por marcação DAPI e Faloidina das células nos revestimentos e nos controles encontram-se nas **Figuras 3.20 - 3.26**.

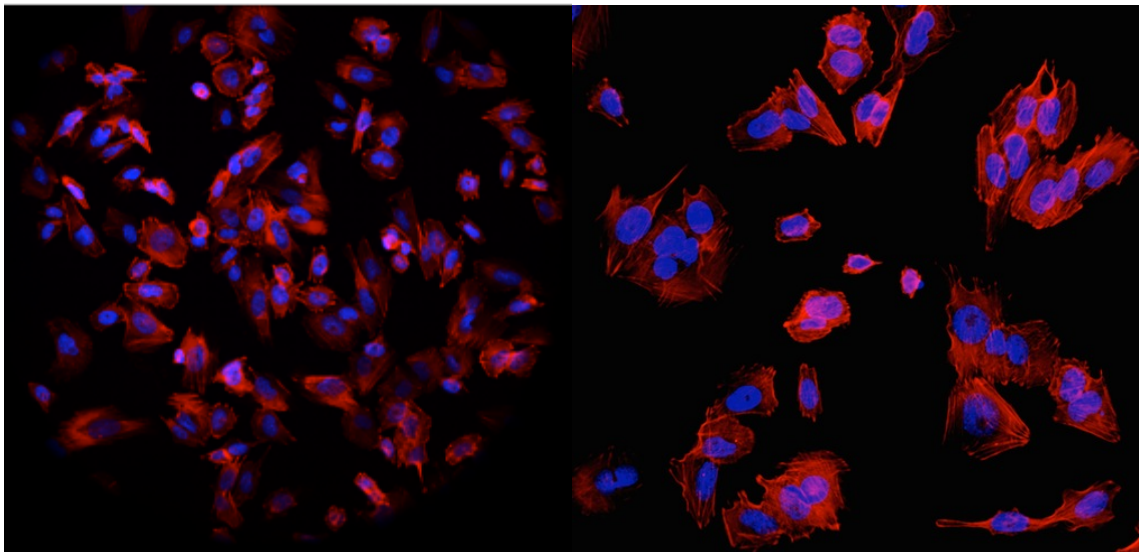


Figura 3.20: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células no controle de células em lamelas de vidro (CCv)

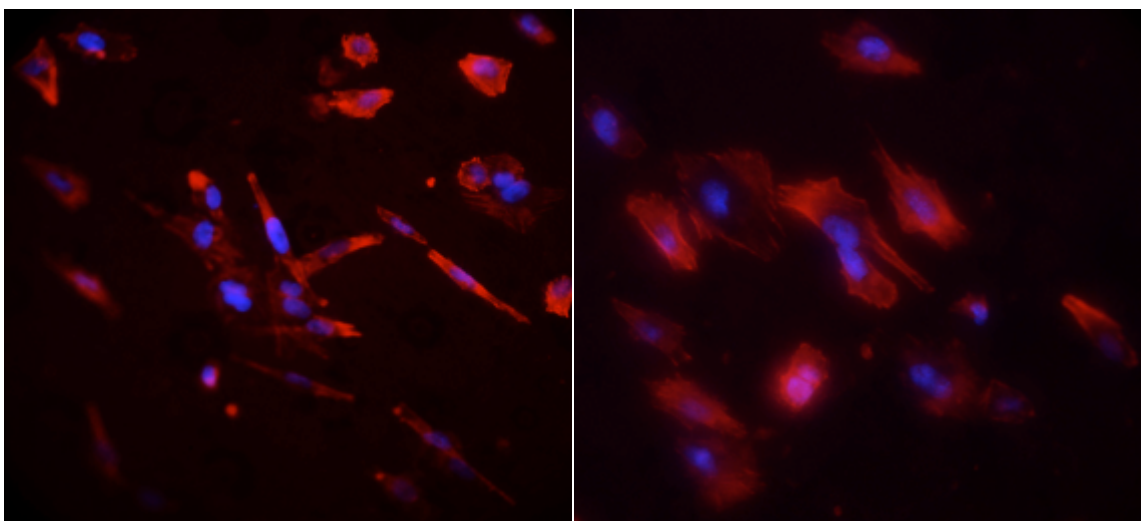


Figura 3.21: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células numa amostra de AZ31 (CCMg)

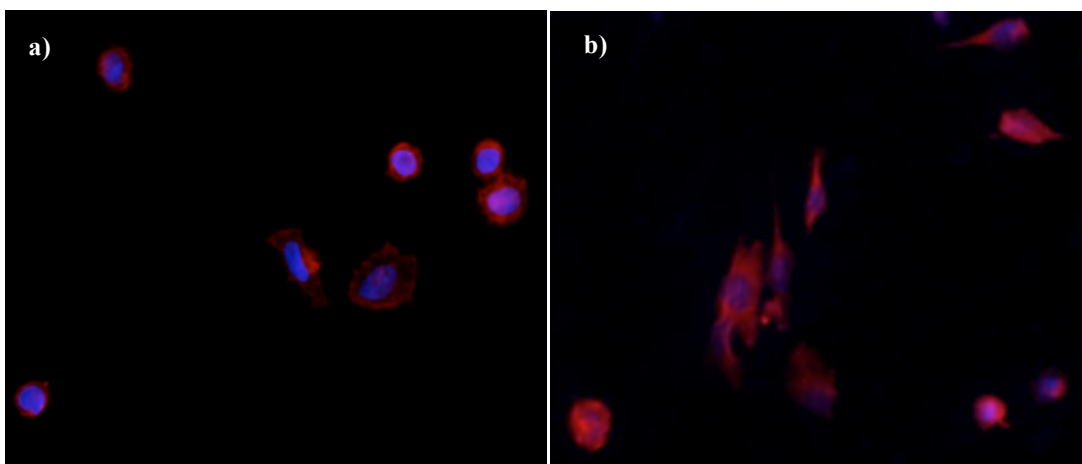


Figura 3.22: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostras de: **a)** Fosfatos **b)** Fosfatos-t

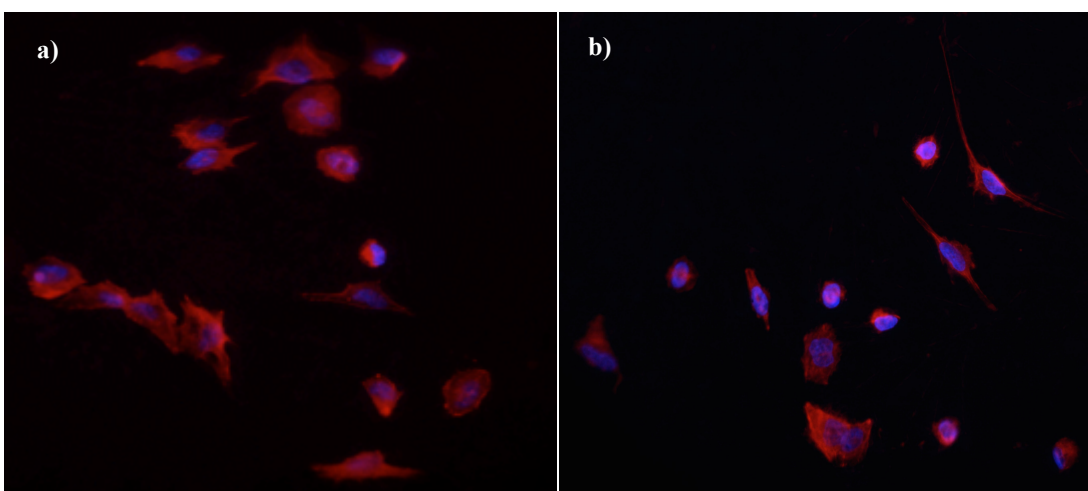


Figura 3.23: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostras de: **a)** Fosfatos-HAp **b)** Fosfatos-HAp-t

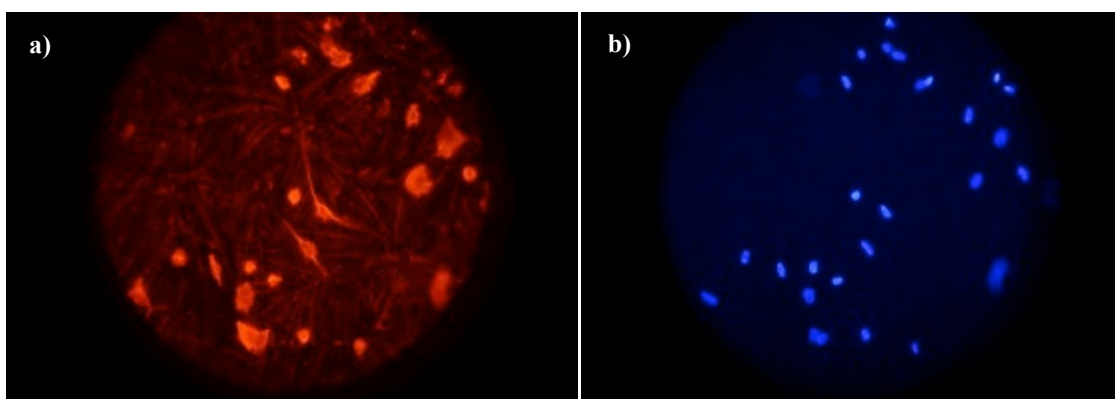


Figura 3.24: Imagens de fluorescência de células na amostra de Fosfatos-HAp-t: **a)** Marcação Faloidina **b)** Marcação DAPI

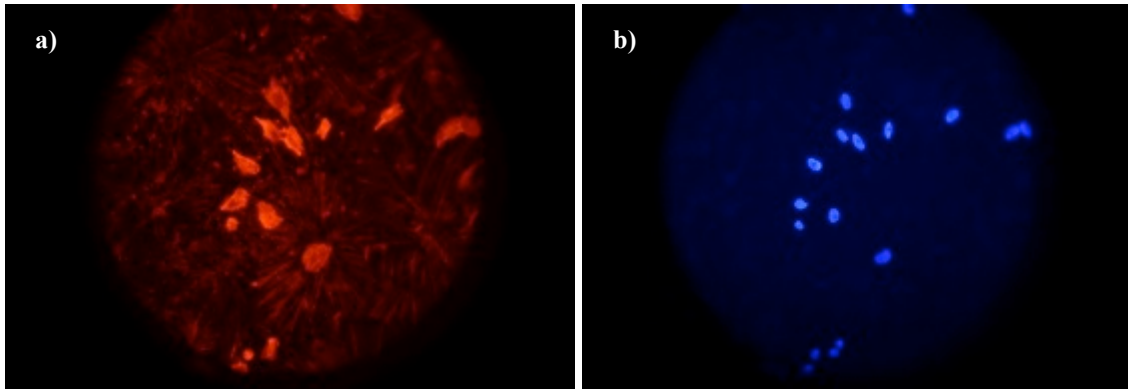


Figura 3.25: imagens de fluorescência de células na amostra de Fosfatos-HAp-t: **a)** e **b)** Marcação
Marcação DAPI

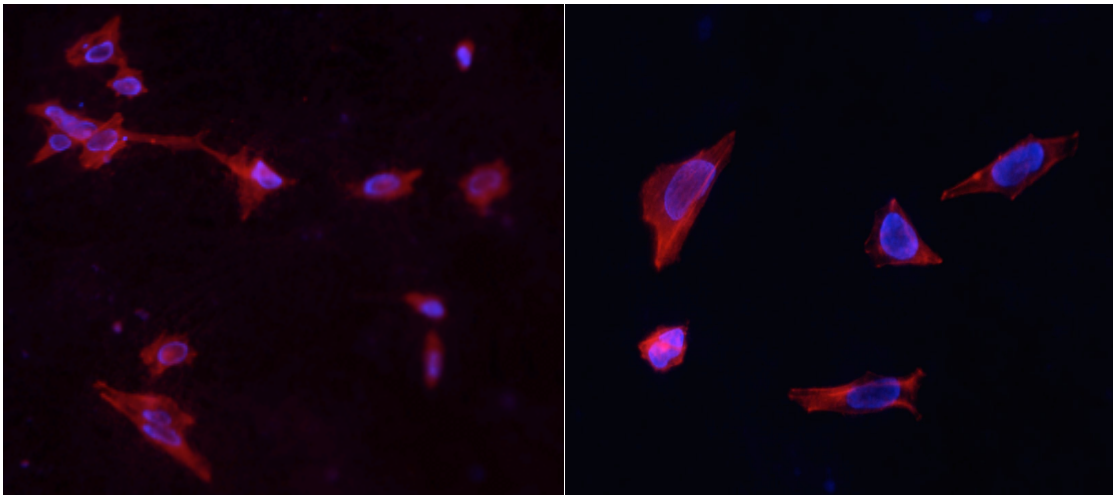


Figura 3.26: Sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por marcação
DAPI (azul) e Faloidina (vermelho) das células em amostras de Fosfatos-HAp/GO

Através da marcação DAPI e Faloidina foi possível observar as células semeadas em vidro (controle - CCv) (**Figura 3.20**), na superfície da liga AZ31 e em cada revestimento, excepto no revestimento de Fosfatos-HAp/GO-t. Na liga de Mg (**Figura 3.21**) as células parecem mais “esticadas” enquanto que na **Figura 3.22** (amostras com o revestimento de fosfatos), se observam poucas células de forma arredondada e com o citosqueleto mais condensado que parece encontrarem-se num processo de morte celular. Nas **Figuras 3.23-3.25** observam-se as células nas amostras revestidas com Fosfatos-HAp. Estas possuem uma forma arredondada e poligonal e, é possível ainda notar citosqueletos que seguem a estrutura do revestimento (ramificações da base de fosfatos). Na amostra que inclui o GO (**Figura 3.26**) observaram-se algumas células aderidas ao revestimento e com a sua forma característica. No entanto, as observações microscópicas não revelaram um grande número de células nestas amostras, como seria de esperar tendo em conta os resultados dos testes de viabilidade.

As imagens de SEM das células fixadas 24h após a sementeira nas superfícies da liga de Mg AZ31 (CCMg) e nas superfícies revestidas com Fosfatos-HAp/GO, tratada e não tratada encontram-se apresentadas nas **Figuras 3.27 - 3.29**.

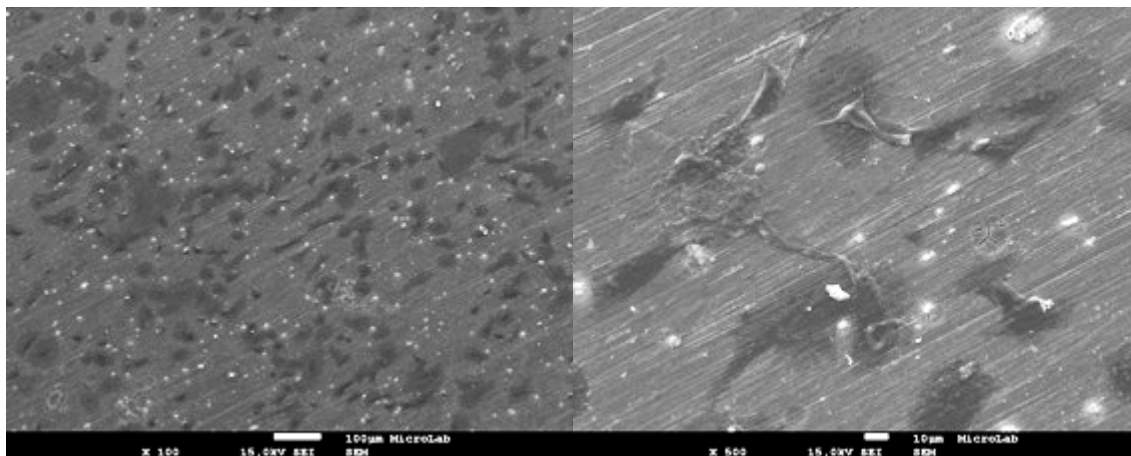


Figura 3.27: Imagens de SEM de células na superfície de Mg (CCMg)

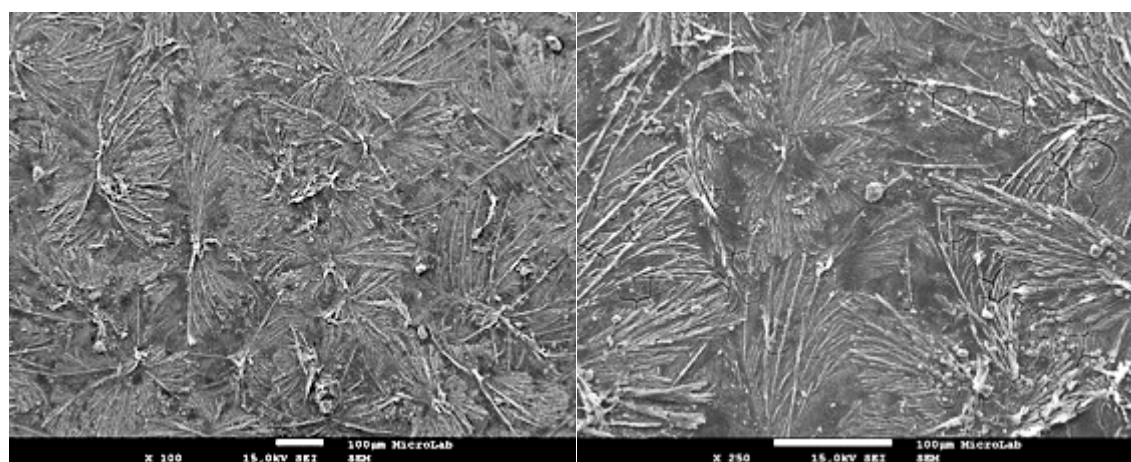


Figura 3.28: Imagens de SEM de células do revestimento Fosfatos-HAp/GO

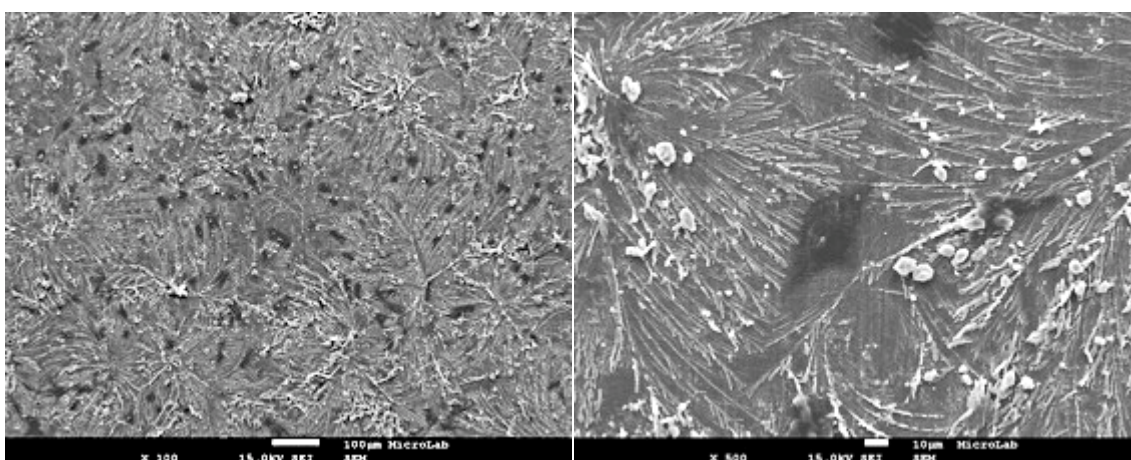


Figura 3.29: Imagens de SEM de células do revestimento Fosfatos-HAp/GO-t

As imagens de SEM revelam a presença de células aderidas nas diversas amostras. Na liga AZ31 (CCMg) observa-se células de várias formas e com tamanhos entre 20 – 60 μm de comprimento (**Figura 3.27**). O revestimento Fosfatos-HAp/GO (**Figura 3.28**), foi o que apresentou os melhores resultados em termos de viabilidade celular. Comparando a densidade celular nesta amostra e na da liga AZ31 não é perceptível que a densidade celular seja significativamente maior no primeiro caso. No entanto, a observação no revestimento é dificultada pela estrutura dos cristais observada. Na **Figura 3.29**, observam-se muitas células aderidas na amostra com o revestimento de Fosfatos-HAp/GO-t. Neste tipo de amostras não foi possível observar através de microscopia de fluorescência células no final da cultura (após 72h). No entanto, as imagens de SEM da amostra fixa às 24h de cultura foi possível ver que as células aderiram ao revestimento encontrando-se dispersas por toda a amostra, o que está de acordo com os resultados dos testes de viabilidade celular. Com estas observações é possível concluir que o revestimento que inclui Fosfatos-HAp/GO parece permitir uma boa adesão das células e que estes revestimentos têm um potencial para aplicações em implantes ósseos biodegradáveis pois aliam as vantagens inerentes ao facto de se degradarem de forma mais controlada do que as ligas de Mg a uma resposta celular aceitável, o que é essencial para o desempenho de um implante ósseo.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho foi possível desenvolver revestimentos multifuncionais: revestimentos de fosfatos, fosfatos com adição de nanopartículas de hidroxiapatite e fosfatos com adição de nanopartículas e incorporação de óxido de grafeno, através do método de eletrodeposição/eletroforese. Após a caracterização físico-química dos revestimentos foram obtidas informações relevantes acerca da análise da microestrutura da superfície, cristalinidade, morfologia, composição química e molhabilidade. Foram ainda obtidas informações importantes sobre a degradação em condições fisiológicas. Através destas técnicas de caracterização conclui-se que a estrutura dos fosfatos de magnésio dos revestimentos não tratados é uma estrutura cristalina. Por outro lado, o tratamento térmico permite amorfizar a estrutura dos fosfatos de magnésio. Relativamente à morfologia dos revestimentos não ocorrem diferenças significativas com a adição de nanopartículas de hidroxiapatite e a incorporação de óxido de grafeno. Os ensaios de degradação em condições fisiológicas demonstraram que o tratamento térmico dos revestimentos melhora significativamente as densidades de corrente e o potencial o que permite concluir que estes revestimentos apresentam um efeito de proteção. Por outro lado a adição de GO ao revestimento permite ainda aumentar a resistência à degradação. A interação celular com os revestimentos foi avaliada e permitiu concluir que o tratamento térmico dos revestimentos aparentemente permite melhorar a adesão celular dos osteoblastos, excepto no revestimento Fosfatos-HAp/GO que apresentou uma maior densidade de células aderidas. Nestes ensaios não se verificou em nenhuma das amostras dos materiais testados *in vitro* um aumento significativo da população de células ao longo da cultura.

Como se verificou que o tratamento térmico melhora a resistência à degradação das ligas de Mg bem como aparentemente permite a adesão celular, poderiam ser realizados estudos para aumentar o tempo e/ou a temperatura para uma melhor compreensão do seu efeito, tanto na resistência à degradação como na interação celular. Seria importante aumentar a quantidade de nanopartículas de hidroxiapatite no revestimento para permitir uma melhor osteointegração dos revestimentos. A adição de GO ao revestimento permitiu uma maior resistência à degradação e conduziu a uma boa resposta celular, deste modo poderia ser avaliado a sua incorporação apenas aos fosfatos e avaliar o seu comportamento *in vitro*. Para avaliar a atividade funcional dos osteoblastos na interação com os revestimentos poderiam ser ainda realizados estudos de expressão genética. Por fim, seria importante avaliar o comportamento destes revestimentos *in vivo*.

Bibliografia

- [1] Orthoworld, “The Orthopaedic Industry Annual Report,” 2013.
- [2] S. Yoshizawa, A. Brown, A. Barchowsky, and C. Sfeir, “Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 6, pp. 2834–2842, 2014.
- [3] A. Chaya, S. Yoshizawa, K. Verdelis, S. Noorani, B. J. Costello, and C. Sfeir, “Fracture Healing Using Degradable Magnesium Fixation Plates and Screws,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 73, no. 2, pp. 295–305, 2015.
- [4] G. Eddy Jai Poinern, S. Brundavanam, and D. Fawcett, “Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties, Surface Modifications and Potential as a Biodegradable Orthopaedic Implant,” *Am. J. Biomed. Eng.*, vol. 2, no. 6, pp. 218–240, 2013.
- [5] T. Narayanan, I.-S. Park, and M.-H. Lee, “Modification and Coating Techniques,” in *Surface Modification Of Magnesium and its Alloys for Biomedical Applications*, Elsevier, 2015, pp. 23–227.
- [6] S. Shadanbaz and G. J. Dias, “Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 20–30, Jan. 2012.
- [7] D. O. Costa, P. D. H. Prowse, T. Chrones, S. M. Sims, D. W. Hamilton, A. S. Rizkalla, and S. J. Dixon, “The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 30, pp. 7215–26, Oct. 2013.
- [8] A. Chaya, S. Yoshizawa, K. Verdelis, N. Myers, B. J. Costello, D.-T. Chou, S. Pal, S. Maiti, P. N. Kumta, and C. Sfeir, “In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing,” *Acta Biomater.*, vol. 18, pp. 262–269, 2015.
- [9] H. Mehboob and S. Chang, “Application of composites to orthopedic prostheses for effective bone healing : A review,” *Compos. Struct.*, vol. 118, pp. 328–341, 2014.
- [10] S. Guan, J. Hu, L. Wang, S. Zhu, H. Wang, J. Wang, W. Li, Z. Ren, S. Chen, E. Meng, J. Gao, S. Hou, B. Wang, and B. Chen, “Mg Alloys Development and Surface Modification for Biomedical Application,” in *Magnesium Alloys - Corrosion and Surface treatments*, Frank Czerwinski, Ed. InTech, 2011, pp. 109–152.
- [11] P. Tian and X. Liu, “Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications,” *Regen. Biomater.*, vol. 2, no. 2, pp. 135–151, 2015.

- [12] D. a. Robinson, R. W. Griffith, D. Shechtman, R. B. Evans, and M. G. Conzemius, "In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 5, pp. 1869–1877, 2010.
- [13] J. Wang, L. Qin, K. Wang, J. Wang, Y. Yue, Y. Li, J. Tang, and W. Li, "Cytotoxicity studies of AZ31D alloy and the effects of carbon dioxide on its biodegradation behavior in vitro.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 7, pp. 4416–26, Oct. 2013.
- [14] F. Czerwinski, "Corrosion and Surface Treatments," in *Magnesium Alloys*, InTech, 2011, pp. 1–344.
- [15] G. Wu, J. M. Ibrahim, and P. K. Chu, "Surface design of biodegradable magnesium alloys - A review," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 2–12, 2013.
- [16] S. V Dorozhkin, "Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 7, pp. 2919–34, Jul. 2014.
- [17] R. Harrison, D. Maradze, S. Lyons, Y. Zheng, and Y. Liu, "Corrosion of magnesium and magnesium–calcium alloy in biologically-simulated environment," *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 24, no. 5, pp. 539–546, 2014.
- [18] A. Mochizuki and H. Kaneda, "Study on the blood compatibility and biodegradation properties of magnesium alloys," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 47, pp. 204–210, 2015.
- [19] H. Hornberger, S. Virtanen, and a R. Boccaccini, "Biomedical coatings on magnesium alloys - a review.," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 7, pp. 2442–55, Jul. 2012.
- [20] S. Brundavanam, G. Eddy, J. Poinern, and D. Fawcett, "Chemical immersion coatings to improve biological degradability of magnesium substrates for potential orthopaedic applications," *Int. J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 7–14, 2014.
- [21] S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, M. Yamane, and N. Ohtsu, "In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite.," *Acta Biomater.*, vol. 11, pp. 520–30, Jan. 2015.
- [22] X. Gu, Y. Zheng, Y. Cheng, S. Zhong, and T. Xi, "In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys," *Biomaterials*, vol. 30, no. 4, pp. 484–498, 2009.
- [23] D. Xue, Y. Yun, Z. Tan, Z. Dong, and M. J. Schulz, "In Vivo and In Vitro Degradation Behavior of Magnesium Alloys as Biomaterials," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 28, no. 3, pp. 261–267, 2012.

- [24] S. Hiromoto and M. Tomozawa, "Hydroxyapatite coating of AZ31 magnesium alloy by a solution treatment and its corrosion behavior in NaCl solution," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 19, pp. 4711–4719, Jun. 2011.
- [25] D. Persaud-Sharma and A. McGoron, "Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications," *J. Biomimetics, Biomater. Tissue Eng.*, vol. 29, pp. 997–1003, 2012.
- [26] Y. Chen, Z. Xu, C. Smith, and J. Sankar, "Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 11, pp. 4561–4573, Jul. 2014.
- [27] Y. F. Zheng, X. N. Gu, and F. Witte, "Biodegradable metals," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 77, pp. 1–34, Mar. 2014.
- [28] M. Saremi, S. Mohajernia, and S. Hejazi, "Controlling the degradation rate of AZ31 Magnesium alloy and purity of nano-hydroxyapatite coating by pulse electrodeposition," *Mater. Lett.*, vol. 129, pp. 111–113, Aug. 2014.
- [29] R. a Surmenev, M. a Surmeneva, and A. a Ivanova, "Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis--a review.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 2, pp. 557–79, Feb. 2014.
- [30] D. Johnson and J. Hils, "Phosphate Esters, Thiophosphate Esters and Metal Thiophosphates as Lubricant Additives," *Lubricants*, vol. 1, no. 4, pp. 132–148, 2013.
- [31] T. Ishizaki, I. Shigematsu, and N. Saito, "Anticorrosive magnesium phosphate coating on AZ31 magnesium alloy," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 203, no. 16, pp. 2288–2291, 2009.
- [32] X. J. Cui, C. H. Liu, R. S. Yang, M. T. Li, and X. Z. Lin, "Corrosion Behavior of Phosphate Conversion Coating on AZ31 Mg Alloy in 3.5% NaCl Solution," *Adv. Mater. Res.*, vol. 910, pp. 27–30, 2014.
- [33] J. Ma, M. Thompson, N. Zhao, and D. Zhu, "Similarities and differences in coatings for magnesium-based stents and orthopaedic implants," *J. Orthop. Transl.*, vol. 2, no. 3, pp. 118–130, Jul. 2014.
- [34] S. Baradaran, E. Moghaddam, W. J. Basirun, M. Mehrali, M. Sookhakian, M. Hamdi, M. R. N. Moghaddam, and Y. Alias, "Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite," *Carbon N. Y.*, vol. 69, pp. 32–45, 2014.

- [35] C. Santos, P. S. Gomes, J. a. Duarte, R. P. Franke, M. M. Almeida, M. E. V. Costa, and M. H. Fernandes, “Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 77, pp. 3397–3410, 2012.
- [36] M. Li, Q. Liu, Z. Jia, X. Xu, Y. Cheng, Y. Zheng, T. Xi, and S. Wei, “Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications,” *Carbon N. Y.*, vol. 67, pp. 185–197, Feb. 2014.
- [37] J. D. Núñez, A. M. Benito, R. González, J. Aragón, R. Arenal, and W. K. Maser, “Integration and bioactivity of hydroxyapatite grown on carbon nanotubes and graphene oxide,” *Carbon N. Y.*, vol. 79, pp. 590–604, Nov. 2014.
- [38] N. Ostrowski, B. Lee, D. Hong, P. N. Enick, A. Roy, and P. N. Kumta, “Synthesis, Osteoblast, and Osteoclast Viability of Amorphous and Crystalline Tri-Magnesium Phosphate,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 52–63, 2015.
- [39] Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu, J. Tao, Y. Cai, M. Zhang, H. Pan, X. Xu, and R. Tang, “Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells,” *J. Mater. Chem.*, vol. 17, p. 4690, 2007.
- [40] D. Chen, H. Feng, and J. Li, “Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 11, pp. 6027–53, Nov. 2012.
- [41] V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, and K. S. Kim, “Functionalization of Graphene : Covalent and Non-Covalent Approaches , Derivatives and Applications,” 2012.
- [42] N. Dubey, R. Bentini, I. Islam, T. Cao, A. Helio, C. Neto, and V. Rosa, “Review Article Graphene : A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering,” *Stem Cells Int.*, vol. 2015, pp. 18–23, 2015.
- [43] P. A. A. P. Marques, G. Gonçalves, S. Cruz, N. Almeida, M. K. Singh, J. Grácio, and A. C. M. Sousa, “Functionalized Graphene Nanocomposites,” in *Advances in Nanocomposite Techonology*, Dr. Abbass Hashim, Ed. InTech, 2011, pp. 247–272.
- [44] S. H. Huh, “Thermal Reduction of Graphene Oxide,” *Eng. Technol.*, pp. 73–90, 2010.
- [45] C. Zhao, X. Lu, C. Zanden, and J. Liu, “The promising application of graphene oxide as coating materials in orthopedic implants: preparation, characterization and cell behavior,” *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 1, p. 015019, 2015.

- [46] C. Santos, C. Piedade, P. J. Uggowitzer, M. F. Montemor, and M. J. Carmezim, "Applied Surface Science Parallel nano-assembling of a multifunctional GO / HapNP coating on ultrahigh-purity magnesium for biodegradable implants," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 345, pp. 387–393, 2015.
- [47] E. L. K. Chng and M. Pumera, "The toxicity of graphene oxides: dependence on the oxidative methods used.," *Chemistry*, vol. 19, no. 25, pp. 8227–35, Jun. 2013.
- [48] A. B. Seabra, A. J. Paula, R. De Lima, O. L. Alves, and N. Dura, "Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide," 2014.
- [49] G. Sun, J. Ma, and S. Zhang, "Electrophoretic deposition of zinc-substituted hydroxyapatite coatings," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 39, no. 1, pp. 67–72, 2014.
- [50] a R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, and I. Zhitomirsky, "Electrophoretic deposition of biomaterials.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7 Suppl 5, no. May, pp. S581–S613, 2010.
- [51] R. K. Gupta, K. Mensah-Darkwa, and D. Kumar, "Effect of Post Heat Treatment on Corrosion Resistance of Phytic Acid Conversion Coated Magnesium," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 29, no. 2, pp. 180–186, 2013.
- [52] A. Asami, M. Nakamura, M. Takeuchi, A. Nakayama, and H. Nakamura, "Effects of Heat Treatment of Hydroxyapatite on Osteoblast Differentiation," 2008.
- [53] C. Wu, L. Xia, P. Han, M. Xu, B. Fang, J. Wang, J. Chang, and Y. Xiao, *Graphene oxide modified beta-tricalcium phosphate bioceramics stimulate in vitro and in vivo osteogenesis*. Elsevier Ltd, 2015.
- [54] S. Onder, A. C. Calikoglu-Koyuncu, K. Kazmanli, M. Urgan, G. Torun Kose, and F. N. Kok, "Behavior of mammalian cells on magnesium substituted bare and hydroxyapatite deposited (Ti,Mg)N coatings," *N. Biotechnol.*, vol. 00, no. 00, pp. 16–18, 2014.
- [55] J. Kadkhodapour, H. Montazerian, A. C. Darabi, and A. P. Anaraki, "Failure mechanisms of additively manufactured porous biomaterials: Effects of porosity and type of unit cell," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 50, pp. 180–191, 2015.
- [56] A. Aryaei, A. H. Jayatissa, and A. C. Jayasuriya, "The effect of graphene substrate on osteoblast cell adhesion and proliferation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 9, pp. 3282–3290, 2014.
- [57] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamanuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3," *Biomed. Mater. Res.*, 24 6, pp. 721–734, 1990.
- [58] M. Dunlap and J. E. Adaskaveg, "Introduction to the Scanning Electron Microscope," *Microsc. Microanal.*, p. 52, 1997.

- [59] “SEM.” [Online]. Available: <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>. [Accessed: 22-Sep-2015].
- [60] D. B. Williams and C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: a Textbook for Materials Science*, Springer. 2009.
- [61] “TEM.” [Online]. Available: http://images.slideplayer.com.br/9/1806995/slides/slide_6.jpg. [Accessed: 02-Sep-2015].
- [62] A. F. Microscopy and B. Applications, “General Atomic Force Microscopy,” pp. 1–34, 2012.
- [63] “AFM.” [Online]. Available: <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>. [Accessed: 22-Sep-2015].
- [64] B. Fultz and J. M. Howe, “Diffraction and the X-Ray Powder Diffractometer,” in *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*, 3^o ed., Springer, 2013, pp. 1–15.
- [65] “DRX.” [Online]. Available: http://www.geocities.ws/fisicattus/difracao_rx02.jpg.
- [66] L. Feng, S. H. Li, Y. S. Li, H. J. Li, L. J. Zhang, J. Zhai, Y. L. Song, B. Q. Liu, L. Jiang, and D. B. Zhu, “Super-hydrophobic surfaces: From natural to artificial,” *Adv. Mater.*, vol. 14, no. 24, pp. 1857–1860, 2002.
- [67] “Ângulo de Contacto.” [Online]. Available: <http://ctborracha.com/wp-content/uploads/2014/10/Fig4-Angulo-contacto-molhabilidade.png>. [Accessed: 20-Sep-2015].
- [68] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. 2005.
- [69] P. Taylor, C. M. Brislawn, and M. D. Quirk, “Encyclopedia of Optical Engineering,” no. April 2013, pp. 37–41, 2003.
- [70] H.-J. Hausser and R. E. Brenner, “Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 333, no. 1, pp. 216–22, Jul. 2005.
- [71] “Saos-2 (ATCC HTB-85).”
- [72] N. V Kitikova, I. L. Shashkova, and a G. D, “Effect of Thermal Treatment on Sorption Activity of Calcium and Magnesium Phosphates,” vol. 75, no. 2, pp. 203–208, 2002.
- [73] H. Zhao, S. Cai, Z. Ding, M. Zhang, Y. Li, and G. Xu, “A simple method for the preparation of magnesium phosphate conversion coatings on a AZ31 magnesium alloy with improved corrosion resistance,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 31, pp. 24586–24590, 2015.
- [74] A. Seyfoori, S. Mirdamadi, M. Mehrjoo, and A. Khavandi, “In-vitro assessments of micro arc oxidized ceramic films on AZ31 magnesium implant: Degradation and cell-surface response,” *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 23, no. 4, pp. 425–433, 2013.

- [75] M. Sadiq, M. Abdennouri, N. Barka, M. Baalala, C. Lamonier, and M. Bensitel, "Influence of the Crystal Phase of Magnesium Phosphates Catalysts on the Skeletal Isomerization of 3,3-dimethylbut-1-ene," *Can. Chem. Trans.*, vol. 3, no. 2, pp. 225–233, 2015.
- [76] M. Kalbacova, A. Broz, J. Kong, and M. Kalbac, "Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells," *Carbon N. Y.*, vol. 48, no. 15, pp. 4323–4329, 2010.
- [77] S. H. Huh, "Thermal Reduction of Graphene Oxide," in *Physics and Applications of Graphene - Experiments*, S. Dr. Mikhailov, Ed. InTech, 2011, pp. 73–90.
- [78] F. Gao, C. Xu, H. Hu, Q. Wang, Y. Gao, H. Chen, Q. Guo, D. Chen, and D. Eder, "Biomimetic synthesis and characterization of hydroxyapatite/graphene oxide hybrid coating on Mg alloy with enhanced corrosion resistance," *Mater. Lett.*, vol. 138, pp. 25–28, 2015.
- [79] H. M. Mousa, K. H. Hussein, H. M. Woo, C. H. Park, and C. S. Kim, "One-step anodization deposition of anticorrosive bioceramic compounds on AZ31B magnesium alloy for biomedical application," *Ceram. Int.*, pp. 1–10, 2015.
- [80] J. Niederlaender, M. Walter, S. Krajewski, E. Schweizer, M. Post, C. Schille, J. Geis-Gerstorfer, and H. P. Wendel, "Cytocompatibility evaluation of different biodegradable magnesium alloys with human mesenchymal stem cells," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 3, pp. 835–43, 2014.
- [81] H. Chang and Y. Wang, "Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds," *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.*, pp. 569–588, 2011.
- [82] M. Nabyouni, Y. Ren, and S. B. Bhaduri, "Magnesium substitution in the structure of orthopedic nanoparticles : A comparison between amorphous magnesium phosphates , calcium magnesium phosphates , and hydroxyapatites," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 11–17, 2015.
- [83] M. Leidi, F. Deller, M. Mariotti, and J. a M. Maier, "High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro," *Magnes. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–6, 2011.

Apêndice

Apêndice A- Sementeira de células

1. Observaram-se as células ao microscópio ótico para confirmar a ausência de contaminações;
2. Removeu-se o meio;
3. Lavou-se a camada de células com 5 ml de PBS;
4. Adicionou-se a 500 μ L tripsina;
5. Frasco de cultura a incubar a 37°C durante 5 minutos;
6. Contagem de células;
7. Diluição da suspensão de células a obter para cada poço;
8. Colocar a quantidade necessária da suspensão em cada poço

Apêndice B – Leitura da absorvância das várias amostras

1. Preparação de uma solução diluída de resazurina em meio celular *McCoy*;
2. Retirar o meio cuidadosamente de cada amostra evitando tocar no fundo para não retirar células contidas nas amostras;
3. Adicionar 380 μ L da solução preparada em 1. a cada tubo;
4. Adicionar 380 μ L da suspensão numa caixa de petri para controle de meio;
5. Colocar as amostras e a caixa de petri a incubar a 37°C durante 3 horas;
6. Pipetar 150 μ L de resazurina de cada tubo e da caixa de petri para uma placa de 96 poços;
7. Leitura das absorvâncias do meio a 570 e 600 nm no leitor de microplacas (Biotek ELX 800UV);
8. Para prosseguir a cultura celular, retirar a restante resazurina das amostras e adicionar 380 μ L de meio de cultura;
9. Colocar as amostras a incubar a 37°C

Apêndice C – Fixação e marcação DAPI e Faloidina

- **DAPI**

1. Lavar a camada de células das amostras com PBS⁺⁺ duas vezes consecutivas;
2. Adicionar a cada amostra 380 µL de paraformaldeído (PFA) 3,7% e deixar 15 min
3. Aspirar o PFA;
4. Lavar duas vezes consecutivas com PBS⁺⁺;
5. Manter a camada de células das amostras em PBS;
6. Reservar no frigorífico

- **Faloidina**

1. Remover o meio de cultura e lavar as células com PBS;
2. Fixar as células com solução fixadora por 10 minutos;
3. Lavar as células com PBS por 30s
4. Adicionar 200 µL de 100nM Acti-stainTM 555 phalloidin
5. Incubar em escuro por 30 min
6. Lavar 3 vezes com PBS

Apêndice D – Fixação de amostras para SEM

1. Lavar as amostras que contêm as células com PBS⁺⁺;
2. Colocar uma solução de 200 µL de GTA diluída em PBS;
3. Deixar as amostras cobertas com papel de alumínio 15 minutos;
4. Lavar com água ultra pura